

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**Mapa génico del plásmido de virulencia de Salmonella enteritides y caracterización de regiones homólogas del cromosoma de Salmonella typhi**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**José Manuel Rodríguez Peña**

**Director**

**Rafael Rotger Anglada**

**Madrid 2005**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Microbiología II**

**Mapa génico del plásmido de virulencia de  
*Salmonella enteritidis* y caracterización de  
regiones homólogas del cromosoma de  
*Salmonella typhi***

Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Farmacia  
por José Manuel Rodríguez Peña

Dirigida por el Dr. Rafael Rotger Anglada

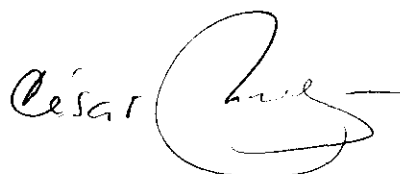
**Madrid, 1996**

D. CÉSAR NOMBELA CANO, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que D. José Manuel Rodríguez Peña ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Rafael Rotger Anglada, el trabajo que presenta para optar al grado de doctor en Farmacia, con el título:  
**Mapa génico del plásmido de virulencia de *Salmonella enteritidis* y caracterización de regiones homólogas del cromosoma de *Salmonella typhi*.**

Y para que conste, firmo la presente  
certificación en Madrid, a 14 de Marzo de 1996.

A handwritten signature in black ink, consisting of the name 'César' followed by a stylized, cursive signature that appears to be 'Nombela'.

Fdo. : Dr. D. César Nombela Cano.

**La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una Beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la formación de personal investigador.**

***A mi familia.***

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo:

Al Dr. César Nombela Cano, por permitirme la realización del mismo en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Al director de esta tesis, Dr. Rafael Rotger Anglada, por la constante ayuda e interés mostrado tanto en su periodo de realización como de escritura.

A Miguel, compañero de fatigas investigadoras, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A María Yuste, por su amistad y permanente apoyo.

A Isabel, Mada, Alejandra, Cristina, Antonia y Alberto por su amistad y colaboración en todo momento.

A Amalia por su amabilidad y colaboración inestimable.

A Maribel, por el excelente trabajo realizado en la secuenciación del DNA.

A Conchita Pintado, Javier Arroyo, Javier Regidor, Humberto, Fede, Victor, Lucía, M. Luisa, Benito, José Alberto, Rosi y en general a todos los compañeros del Departamento, por su ayuda desinteresada.

# ÍNDICE

---

Abreviaturas .....	4
<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.- Plásmidos de virulencia de <i>Salmonella</i>.</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.- Genes descritos en los plásmidos de virulencia de <i>Salmonella</i>.</b> .....	<b>9</b>
1.2.1.- Genes implicados en virulencia. ....	9
1.2.1.1.- Operón <i>spv</i> . ....	9
1.2.1.2.- Genes y regiones implicados en la resistencia al suero. ....	12
1.2.1.3.- <i>vagC/vagD</i> . ....	15
1.2.2.- Otras regiones plasmídicas no implicadas en virulencia. ....	15
1.2.2.1.- IS630. ....	15
1.2.2.2.- <i>t1pA</i> . ....	16
1.2.2.3.- Región de genes de transferencia ( <i>tra</i> ). ....	17
1.2.2.4.- Genes relacionados con la estabilidad y replicación plasmídica. ....	22
1.2.2.5.- Operón <i>samAB</i> . ....	24
1.2.2.6.- Región implicada en síntesis de fimbrias ( <i>pef</i> ). ....	26
<b>1.3.- Familia Dsb de proteínas con actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro en periplasma de bacterias.</b> .....	<b>29</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1.- Materiales.</b> .....	<b>38</b>
2.1.1.- Medios de cultivo. ....	38
2.1.2.- Marcadores de pesos moleculares de DNA. ....	39
2.1.3.- Plásmidos. ....	39
2.1.4.- Cepas. ....	41
2.1.5.- Nomenclatura. ....	41
2.1.6.- Soporte informático. ....	41
<b>2.2. - Métodos.</b> .....	<b>42</b>
2.2.1.- Preparación de DNA genómico de bacterias. ....	42
2.2.2.- Extracción de DNA plasmídico de <i>Salmonella</i> . ....	42
2.2.3.- Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> . ....	43
2.2.4.- Extracción rápida de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> : método <i>boiling</i> . ....	44
2.2.5.- Electroforesis en geles de agarosa. ....	44
2.2.6.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa. ....	44

2.2.7.- Determinación de tamaño, pureza y concentración de DNA. ....	44
2.2.8.- Tratamientos enzimáticos del DNA.....	45
2.2.9.- Transformación de <i>E. coli</i> .....	46
2.2.10.- Hibridación DNA-DNA. ....	47
2.2.11.- Hibridación a partir de colonias ( <i>Colony blot</i> ) .....	50
2.2.12.- Secuenciación automática del DNA. ....	50
2.2.13.- Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R. ....	51
<b>Resultados.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de <i>S. enteritidis</i>.....</b>	<b>54</b>
3.1.1.- Análisis y detección de plásmidos.....	54
3.1.2.- Clonación del plásmido pFM82139. ....	54
3.1.3.- Verificación del origen de las construcciones pMJ y pFM. ....	57
3.1.4.- Cartografiado de los clones pMJ y pFM. ....	57
3.1.4.1.- Cartografiado de la construcción pMJ002B.....	58
3.1.5.- Localización de los fragmentos <i>HindIII</i> en pFM82139. ....	59
3.1.6.- Orientación relativa de los fragmentos <i>HindIII</i> correspondientes a los clones pMJ005, pMJ001, pMJ004, pMJ002A y pMJ003.....	63
3.1.7.- Ordenación de pMJ006 y pMJ002B. ....	65
3.1.8.- Orientación del fragmento <i>HindIII</i> de pMJ006. ....	65
<b>3.2.- Homología con el plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i>. ....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.- Mapa génico del plásmido de virulencia de <i>S. enteritidis</i>.....</b>	<b>71</b>
3.3.1.- Subclonación de las construcciones pMJ.....	71
3.3.2.- Secuenciación parcial de los subclones procedentes de las construcciones pMJ. ....	71
3.3.3.- Análisis de las secuencias obtenidas. ....	73
3.3.4.- Descripción de los resultados de homología. ....	73
3.3.5.- Localización de algunos genes implicados en la resistencia al suero en los plásmidos de virulencia de <i>S. typhimurium</i> y <i>S. enteritidis</i> .....	78
3.3.5.1.- Detección del gen <i>rck</i> .....	78
3.3.5.2.- Detección del gen <i>traT</i> . ....	79
<b>3.4.- Caracterización de las regiones de pFM82139 no estudiadas en otros plásmidos de virulencia.....</b>	<b>81</b>
3.4.1.- Detección de posibles promotores. ....	81

3.4.2.- Detección en pFM82139 de un ORF homólogo a una endonucleasa codificada por el plásmido pKM101.....	81
3.4.3.- Estudio de la región <i>tra</i> .....	87
3.4.3.1.- Secuenciación parcial de subclones de pMJ002B.....	87
3.4.3.2.- Caracterización de las posibles deleciones sufridas por la región <i>tra</i> de pFM82139.....	88
3.4.3.3.- Estudio de la funcionalidad del promotor Py.....	91
<b>3.5.- Detección de regiones homólogas entre pFM82139 y el cromosoma de <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>91</b>
3.5.1.- Caracterización y aislamiento de regiones homólogas con <i>Salmonella</i> <i>typhi</i> .....	91
3.5.1.1.- Hibridación de pFM82139 frente a DNA cromosómico de <i>S. typhi</i> 5866.....	92
3.5.1.2.- Acotamiento de la región homóloga pMJ003- <i>S. typhi</i> 5866.....	93
3.5.1.3.- Clonación de la región homóloga presente en <i>S. typhi</i> 5866.....	94
3.5.2.- Presencia de regiones homólogas a pFM82139 en el cromosoma de <i>S.</i> <i>enteritidis</i> .....	97
<b>3.6.- Caracterización de la construcción pST93.....</b>	<b>98</b>
3.6.1.- Análisis restrictivo de pST93.....	98
3.6.2.- Subclonación de pST93.....	99
3.6.3.- Secuenciación parcial de los clones procedentes de pST93.....	99
3.6.4.- Secuenciación y estudio comparativo de los ORFs de <i>Salmonella</i> relacionados con <i>dsbA</i> de <i>E. coli</i> .....	103
<b>Discusión.....</b>	<b>110</b>
<b>4.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de <i>S. enteritidis</i> y su comparación con el de <i>S. typhimurium</i>.....</b>	<b>111</b>
<b>4.2.- Mapa génico del plásmido de virulencia de <i>S. enteritidis</i>.....</b>	<b>112</b>
4.2.1.- Región <i>spv</i> .....	113
4.2.2.- Las regiones de replicación y partición.....	114
4.2.3.- Región no homóloga entre <i>samAB</i> y la región <i>tra</i> .....	114
4.2.4.- Región <i>tra</i> .....	115
4.2.5.- Zona <i>peff-dle</i> y región homóloga de <i>S. typhi</i> .....	117
<b>Conclusiones.....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>124</b>

# ABREVIATURAS

$\Delta$ : Delección.  
A: Absorbancia, Adenina (según contexto).  
aa: Aminoácidos.  
Amp: Ampicilina.  
ATP: Adenosina-5'-trifosfato.  
CIAP: Fosfatasa alcalina de intestino de ternera.  
CTAB: Bromuro de N-cetil-trimetil amonio.  
D.O.: Densidad óptica.  
dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato.  
dCTP: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato.  
dGTP: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato.  
Dig-dUTP: 11-(2'-desoxiuridina-5'-trifosfato) digoxigenina.  
DTT: Ditioneitol.  
dTTP: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato.  
EDTA: Acido etilén-diamino tetraacético.  
EMBL: European Molecular Biology Laboratory.  
EtBr: Bromuro de Etidio.  
IPTG: Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.  
LB: Medio Luria Bertani.  
MCS: Sitio de clonación múltiple.  
ORF(s): Marco(s) abierto(s) de lectura.  
rpm: Revoluciones por minuto.  
SDS: Lauril sulfato sódico.  
TE: Tampón Tris-EDTA.  
Tris: Tri-(Hidroximetil)-aminometano.  
U: Unidad de actividad específica.  
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Plásmidos de virulencia de *Salmonella*.

*Salmonella* se ha convertido en la última década en centro de atención de numerosos grupos de investigación, que tratan de estudiar su capacidad patogénica desde el punto de vista genético y molecular. Existen varios motivos que justifican este interés. *Salmonella* es una bacteria ubicua que causa enfermedades tanto en los países económicamente deprimidos como en los más desarrollados. Es un modelo biológico de interacción huésped/parásito, al ser una bacteria que infecta a una gran variedad de animales, causa infecciones localizadas y sistémicas, y puede vivir intracelularmente resistiendo la acción de las células fagocitarias.

La mayor parte de los serotipos pueden causar gastroenteritis en el hombre, aunque *Salmonella enteritidis* es el principal responsable de los casos en España, seguido de *Salmonella typhimurium*. La bacteria penetra en el huésped por vía digestiva, generalmente a través de los alimentos contaminados. Se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado, invadiéndolas y atravesando la mucosa. Una vez en la submucosa se multiplica, provocando un cuadro diarreico (Rotger *et al.*, 1996). En el hombre, *Salmonella typhi* es capaz de diseminarse sistémicamente, multiplicándose en ganglios linfáticos, bazo e hígado, y causando un cuadro febril conocido como fiebre tifoidea, a diferencia de la mayoría del resto de serotipos conocidos como no tifoideos. Los serotipos causantes de gastroenteritis pueden también diseminarse en pacientes debilitados, principalmente niños y ancianos, y en enfermos de SIDA, produciendo septicemias a menudo mortales.

Es sabido que en *Escherichia coli* la virulencia se asocia a la adquisición de plásmidos, y que este tipo de elementos extracromosómicos son también esenciales en otras enterobacterias patógenas, como *Shigella* y *Yersinia*. En diversos serotipos de *Salmonella* se han descrito plásmidos (54-90 kb) portadores de genes de virulencia, de tamaño variable pero constante dentro de cada serotipo por lo cual se les ha denominado plásmidos serotipo-específicos (Helmuth *et al.*, 1985; Popoff *et al.*, 1984).

Los plásmidos de virulencia de *Salmonella* inicialmente fueron denominados "crípticos" por su función desconocida. Posteriormente se les llamó de virulencia (calificativo empleado actualmente) al observarse su posible implicación en la patogenia de *Salmonella*, describiéndose fundamentalmente los de *S. typhimurium* (90 kb) (Jones *et al.*, 1982), *S. enteritidis* (60 kb) (Hovi *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1985), *S. dublin* (80 kb) (Chikami *et al.*, 1985; Terakado *et al.*, 1983), *S. choleraesuis* (50 kb) (Kawahara *et al.*, 1988), *S. gallinarum* (85 kb) (Barrow *et al.*, 1987) y *S. pullorum* (85 kb) (Barrow y Lovell, 1988). El plásmido de *S. typhimurium* es el mejor caracterizado, en contraposición con el de *S. enteritidis*. En un estudio realizado mediante el análisis por microscopía electrónica de heterodúplex de los cuatro primeros citados se comprobó una elevadísima homología global de los mismos, con la excepción del plásmido de *S. dublin* que

presentó unos valores medios, indicando estar más alejado filogenéticamente de los tres restantes (Montenegro *et al.*, 1991).

Se ha demostrado en modelos de infección animal (ratón o pollo) que los plásmidos de *Salmonella* facilitan la diseminación sistémica, la multiplicación en ganglios linfáticos, bazo e hígado, pero que no afectan al desarrollo de gastroenteritis (Guiney *et al.*, 1988; Heffernan *et al.*, 1987; Hackett *et al.*, 1986; Pardon *et al.*, 1986). Este fenotipo fue asignado a una región plasmídica conservada entre serotipos (homología inter-serotipo) de aproximadamente 8 kb (Williamson *et al.*, 1988).

Los plásmidos de virulencia de *Salmonella* parecen tener un papel más limitado que los de otras enterobacterias, y quizás sean necesarios sólo para la infección en animales; de hecho, *S. typhi* carece de plásmido de virulencia conocido (Fierer *et al.*, 1992; Roudier *et al.*, 1990).

El dato más concluyente acerca de la participación del plásmido en la diseminación extraintestinal de *Salmonella* lo aportaron Gulig y Doyle (1993). En su estudio observaron diferencias en la tasa de multiplicación de dos cepas isogénicas de *S. typhimurium* (con y sin plásmido de virulencia) *in vivo*. Para llevar a cabo este estudio se empleó como marcador genético un plásmido termosensible que no se replicaba a 37°C, que se transformó en ambas cepas. De este modo el número de bacterias portadoras del plásmido termosensible, tras un periodo de crecimiento a 37°C, sería inversamente proporcional a su tasa de crecimiento. Tras la infección vía oral de ratones y la recuperación de las bacterias procedentes de ganglios linfáticos e hígado cinco días más tarde, se comprobó que la cepa portadora del plásmido de virulencia crecía más rápidamente que la cepa curada del mismo (sin plásmido), no viéndose diferencias en cuanto a mortalidad o desplazamiento a través de los tejidos. Iguales resultados se obtuvieron cuando los ratones fueron tratados con gentamicina, antibiótico que elimina las bacterias extracelulares, deduciéndose que el incremento en la tasa de multiplicación se produce en un estadio intracelular de la bacteria. Realizando el mismo ensayo únicamente con la región de virulencia (8 kb), la cual se comentará a continuación, se registraron idénticos resultados, indicando que estos genes de virulencia por sí solos son suficientes para conferir a la bacteria un incremento de su tasa de multiplicación *in vivo* frente a cepas carentes de dichos genes. Sin embargo otros autores no han observado contribución alguna de los genes de virulencia a la supervivencia o crecimiento de *Salmonella* en macrófagos en experimentos *in vitro* (Riikonen *et al.*, 1992; Gulig y Curtiss III, 1987), por lo que todavía no está clarificado en que circunstancias se produciría el aumento de la tasa de multiplicación debida a la presencia del plásmido de virulencia.

## 1.2.- Genes descritos en los plásmidos de virulencia de *Salmonella*.

### 1.2.1.- Genes implicados en virulencia.

#### 1.2.1.1.- Operón *spv*.

Una vez que el fenotipo fundamental atribuido al plásmido de virulencia de *Salmonella* fue el de facilitar la diseminación sistémica y la multiplicación en ganglios linfáticos, bazo e hígado en el modelo de infección animal, diversos grupos de investigación se plantearon acotar la región plasmídica responsable de dicho fenotipo. Mediante la clonación de diferentes fragmentos del plásmido de virulencia en cepas de *Salmonella* curadas de él (sin plásmido), se ha podido definir una región de 8 kb, altamente conservada en los plásmidos de los distintos serotipos, capaz de devolver el fenotipo de virulencia en el ratón cuando es clonada en un vector de bajo número de copias (Gulig *et al.*, 1992; Krause *et al.*, 1991a; Williamson *et al.*, 1988a). Los diversos grupos de investigación que han aislado e identificado (fundamentalmente mediante clonación y mutaciones por inserción y delección) genes de virulencia han empleado diversas nomenclaturas: *mka* (Taira y Rhen, 1989), *mkf* (Norel *et al.*, 1989), *spv* (Caldwell y Gulig, 1991), *vir* (Gulig y Chiodo, 1990) y *vag* (Pullinger *et al.*, 1989) en *S. typhimurium*; *mba* (Matsui *et al.*, 1991) en *S. choleraesuis* y *vsd* (Krause *et al.*, 1991a) en *S. dublin*; pero se ha llegado al acuerdo de nombrarlos de una manera unificada como *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) (Gulig *et al.*, 1993) (Figura 1.1). Los datos expuestos a continuación representan un consenso entre los resultados obtenidos por los distintos grupos en cada uno de estos serotipos; las diferencias observadas son mínimas y pueden tener su causa tanto en diferencias leves entre serotipos como a variaciones en el método experimental.

La región anteriormente citada de 8 kb está compuesta de cinco genes, *spvRABCD* que forman un operón. Los genes *spv* son todos transcritos en la misma dirección, empezando desde *spvR*, que es un gen regulador, y posteriormente los cuatro genes estructurales. Un sexto marco abierto de lectura, denominado *orfE*, ha sido descrito a continuación de *spvD*; sin embargo, se ha demostrado mediante ensayos realizados en ratón su no participación en virulencia (Gulig *et al.*, 1992; Krause *et al.*, 1991a).

Las secuencias nucleotídicas de los genes *spv* se obtuvieron inicialmente de los plásmidos correspondientes a *S. typhimurium*, *S. dublin* y *S. choleraesuis* (Gulig *et al.*, 1993), y muestran una variación en porcentaje de homología inferior al 0,5%; posteriormente se ha publicado la secuencia de la gran mayoría de los genes *spv* de *S. enteritidis* (Suzuki *et al.*, 1994) presentando igualmente una homología prácticamente total con los citados anteriormente. Las secuencias correspondientes a los genes *spv* no presentan hasta el momento homología con ninguna otra depositada en bancos de secuencias.

En la secuencia de las proteínas codificadas por los genes *spv*, no se ha observado la existencia de péptidos señal reconocibles, ni de regiones hidrofóbicas que pudiesen estar asociadas a membrana citoplásmica (Gulig *et al.*, 1993; Taira *et al.*, 1991). En cuanto a posibles proteínas homólogas, el único caso claro corresponde a SpvR que en su extremo amino terminal presenta homología con proteínas de la familia LysR de reguladores transcripcionales. Esta familia de proteínas presentan en común el motivo "hélice-vuelta-hélice" de unión a DNA en su extremo amino terminal (Schell, 1993; Henikoff *et al.*, 1988). La región amino terminal de SpvB es similar a la proteína CatM de *Acinetobacter calcoaceticus*, perteneciente a la familia LysR, y que actúa como represor del operón *cat*, responsable de la degradación del catecol. En cambio, SpvA presenta su extremo carboxilo terminal homólogo al amino de SpvB pero carece del motivo de unión a DNA (Abe *et al.*, 1994).

El papel de la región *spv* durante la infección de *Salmonella* en términos de mecanismo de acción es desconocido.

La función de SpvR es la más estudiada y mejor conocida. Así en los primeros estudios mediante fusiones génicas con el gen *lacZ* (empleado como gen testigo, valorando su expresión mediante la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa) se comprobó que la presencia en *trans* de *spvR* incrementaba drásticamente la expresión de las fusiones *spvR-lacZ*, *spvA-lacZ* y *spvA-spvB-lacZ*; no observándose inducción de las fusiones *spvB-lacZ* y *spvC-lacZ*. Todos estos datos indicaban la existencia de una estructura en operón con la presencia de dos posibles unidades transcripcionales inducidas por SpvR, que corresponderían al propio *spvR* y al resto de genes *spv* (Coynault *et al.*, 1992; Caldwell y Gulig, 1991; Taira *et al.*, 1991a). Corroborando los datos anteriores se ha demostrado que SpvR se une a la región promotora situada antes de *spvA* (Matsui *et al.*, 1993).

Además, se han identificado dos posibles lugares para la iniciación de la transcripción del operón, antes de *spvA*, dando como resultado cuatro especies fundamentales de RNA mensajeros detectadas por hibridación, *spvA*, *spvAB*, *spvABC* y *spvABCD*, cuya proporción desciende en ese mismo orden (Matsui *et al.*, 1993; Krause *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1991).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la regulación a la que está sometido el operón *spv*. Una vez demostrado el papel crucial desarrollado por SpvR en la expresión de los genes situados a continuación, se comprobó que la expresión de los mismos estaba influenciada por la fase de crecimiento, siendo máxima en fase estacionaria y dependiente de SpvR (Coynault *et al.*, 1992; Krause *et al.*, 1992). Por otro lado, dentro del complejo sistema de regulación del operón *spv*, SpvA y SpvB ejercen un efecto represor sobre la expresión de *spvR*, como si se tratase de un sistema de retroalimentación negativa (Abe y Kawahara, 1995; Spink *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1994). En cuanto a la influencia del medio externo sobre la expresión de los genes *spv*, se han realizado estudios *in vitro* con *S. dublin* de los que se desprende que la falta de disponibilidad de glucosa en el medio es la señal fundamental para la activación de la expresión de *spvA*, *B* y *C*.

Otras señales inductoras de la expresión son: la limitación de hierro, pH ácido y choque térmico (42°C). La combinación de todos estos factores gradaría el nivel de expresión, destacando la máxima inducción obtenida de la expresión de *spvA* al unir la falta de glucosa al choque térmico (Valone *et al.*, 1993). Diversos grupos han demostrado que la transcripción de *spvR* depende del producto del gen cromosómico *rpoS* (*katF*), que codifica para un factor  $\sigma$  alternativo ( $\sigma^{38}$ ) de la RNA-polimerasa, que media la transcripción selectiva de ciertos genes en condiciones de falta de nutrientes. Se ha comprobado empleando diversas técnicas (fundamentalmente fusiones génicas con *lacZ* y mutantes de *Salmonella* deficientes en la producción de RpoS) que la transcripción del gen regulador *spvR*, y por ende del resto de genes bajo su control, depende conjuntamente de la actividad de RpoS y SpvR (Heiskanen *et al.*, 1994; Kowarz *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 1992).

También el gen cromosómico *hns* ha mostrado ejercer un control, en este caso negativo, sobre la transcripción de *spvR*. Este gen codifica una proteína (H-NS) similar a las histonas de eucariotas y que afecta al superenrollamiento del DNA (Harrison *et al.*, 1994) en respuesta a factores ambientales como la osmolaridad del medio. La sobreexpresión de *hns* reprime totalmente a *spvR* (O'Byrne y Dorman, 1994). Un resumen de la situación de los genes y las distintas regulaciones descritas en el operón *spv* se muestra en la Figura 1.1.

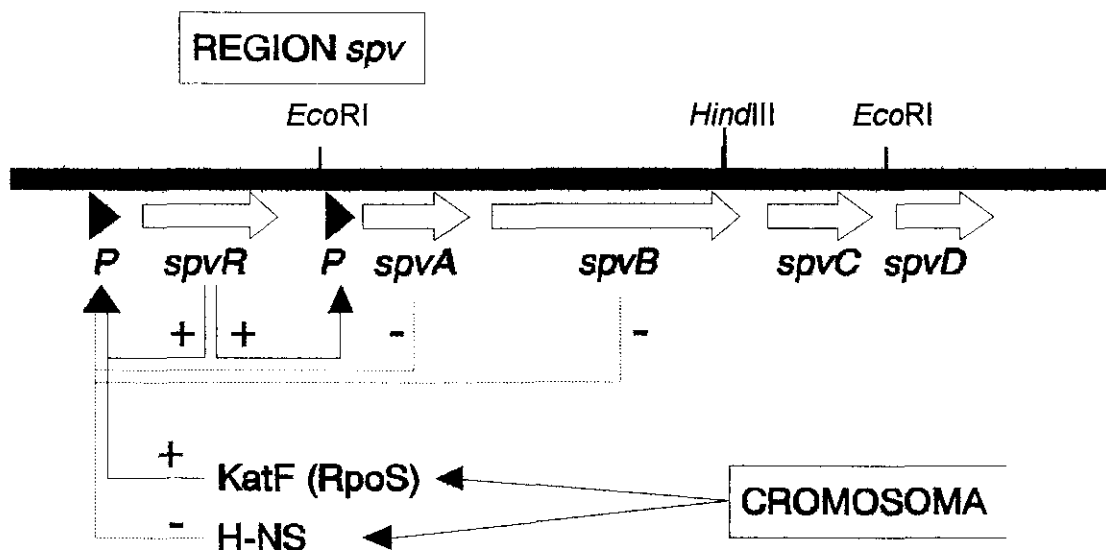


Figura 1.1.- Mapa de la región *spv* del plásmido de *Salmonella typhimurium*.

La expresión de los genes *spv* en condiciones de estrés ambiental o metabólico hace suponer que se induzcan cuando *Salmonella* esté parasitando intracelularmente. Una vez que el papel del operón *spv* *in vivo* se ha relacionado con un incremento de la tasa de crecimiento intracelular, se han realizado diversos ensayos dirigidos al estudio de la expresión del operón *spv* después de la entrada de la bacteria en células de mamífero. Estos estudios han mostrado que la expresión de

*spv* es rápidamente inducida tras la entrada de la bacteria en macrófagos, células epiteliales y hepatocitos, empleando como testigos fusiones *spvR-spvB-lacZ* y fusiones de *spvA* y *spvR* (en presencia de *spvR* silvestre en la célula) con los genes *pap* de *E. coli* que codifican la síntesis de fimbrias (Rhen *et al.*, 1993; Fierer *et al.*, 1993). Se ha observado en *S. dublin* que mutantes deficientes en RpoS, tanto portadores como no del plásmido de virulencia, se mostraron atenuados en ensayos realizados en ratón; esto indica que RpoS no solamente controla al operón *spv*, sino también a otros genes cromosómicos no identificados hasta el momento, que contribuyen a la capacidad del microorganismo para sobrevivir y multiplicarse *in vivo* (Chen *et al.*, 1995). En definitiva, se ha propuesto un modelo de regulación del operón *spv* en el cual tanto RpoS y SpvR son requeridas para alcanzar la máxima expresión desde los promotores de *spvR* y *spvA*.

Como colofón a la sucesión de controles a los que parece estar sometido el operón *spv*, fundamentalmente a través del gen regulador *spvR*, han aparecido recientemente datos que indican la existencia de posibles alelos de *spvR* entre los distintos plásmidos de los distintos serotipos (con sustituciones de nucleótidos conservadas dentro de cada serotipo) cuyos productos presentarían una capacidad variable de inducir la transcripción desde el promotor de *spvA*. La mayor capacidad de inducción la presentaría el alelo de *S. dublin*, seguida del de *S. enteritidis* y por último el de *S. typhimurium* (Taira *et al.*, 1995). Lógicamente, estos resultados necesitarán un estudio más profundo, y de confirmarse habría que evaluar su influencia en la virulencia de cada serotipo.

#### **1.2.1.2.- Genes y regiones implicados en la resistencia al suero.**

Otro fenotipo asociado a los plásmidos de virulencia de *Salmonella* es su participación en la resistencia a la acción bacteriolítica del complemento, mediada por la inserción en la membrana externa del complejo terminal del complemento C5b-9 (complejo de ataque a membrana MAC) (Guiney *et al.*, 1994). *Salmonella*, siendo un parásito intracelular facultativo, en algún momento durante su ruta de infección se encuentra expuesto a fluidos extracelulares con presencia del complemento. De todas maneras, los resultados aportados por los diversos grupos de investigación, como se comentará a continuación, son muy variables e incluso contradictorios, pudiéndose asignar estas divergencias a características específicas de las cepas empleadas (incluso dentro de cada serotipo) y a diferencias en la metodología experimental utilizada en cada caso. No obstante, la aportación del plásmido de virulencia a la resistencia al suero se hace patente en el fondo genético de *Salmonella* cuando la elevada resistencia codificada por el cromosoma se encuentra disminuída de alguna manera.

En los serotipos de *Salmonella* no tifoideos los determinantes que median la resistencia al suero son los lipopolisacáridos (LPS) y ciertas proteínas de membrana externa. De cualquier

forma, los LPS son los principales implicados en la resistencia al suero (Heffernan *et al.*, 1992). Estos LPS poseen largas cadenas oligosacáridicas que constituyen el antígeno O y van a provocar que el componente terminal del complemento C5b-9 se forme a cierta distancia de la membrana externa, impidiendo la inserción del MAC en ella.

En los primeros trabajos de caracterización de los plásmidos de virulencia se comenzó a postular su posible participación en la resistencia al suero, observándose que cepas carentes del plásmido de *S. enteritidis*, *S. dublin* y *S. typhimurium* presentaban un fenotipo de cierta sensibilidad al suero frente a las portadoras de plásmido, que eran resistentes (Helmuth *et al.*, 1985). Posteriormente se describió que una cepa de *S. typhimurium* curada del plásmido de virulencia era incapaz de crecer en suero humano (Hackett *et al.*, 1986), mientras que en otro experimento, empleando otra cepa, no se encontró alteración de la resistencia. Además, se comprobó que la ausencia del plásmido no conllevaba variación en el perfil lipopolisacáridico (Gulig y Curtiss III, 1987). Entre dos cepas de *S. enteritidis*, una silvestre y la otra curada del plásmido, tampoco se observó diferencia en la resistencia natural frente a la acción del complemento (Hovi *et al.*, 1988).

Los trabajos encaminados a estudiar las posibles zonas plasmídicas implicadas en la resistencia al suero permitieron la caracterización de dos genes, *traT* y *rck*, y una región reguladora denominada *rsk*.

El gen *traT* forma parte del operón de transferencia de plásmidos conjugativos del complejo IncF. El producto de *traT* es una proteína de membrana externa (TraT) que en combinación con el producto de un gen colindante, *traS*, es responsable del fenómeno de exclusión de superficie (imposibilitar que una bacteria portando un plásmido conjugativo actúe como receptora de otro plásmido relacionado con él) y fue descrita en *E. coli* como responsable de inducir cierta resistencia al suero. Además, mediante ensayos de *colony blot*, empleando como sonda un fragmento de *traT* perteneciente al plásmido conjugativo R6-5, se obtuvieron un elevado número de hibridaciones positivas en cepas de *S. typhimurium* (Montenegro *et al.*, 1985). La asociación entre *traT* y la resistencia al suero se observó al transformar con *traT* procedente del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* cepas de *E. coli* sensibles al suero, y comprobar que presentaban un ligero incremento en su resistencia a este. Igualmente se comprobó que una forma mutada de *traT* confería a *S. typhimurium* un incremento en su sensibilidad al suero (Rhen y Sukupolvi, 1988). Con posterioridad se realizaron experimentos transformando con los plásmidos de *S. typhimurium* y *S. dublin* una cepa de *E. coli* sensible al suero y observando que mientras en el primer caso la bacteria presentaba resistencia, al portar el plásmido de virulencia de *S. dublin* este fenotipo no aparecía. Realizando hibridaciones con una sonda de *traT* frente al plásmido de *S. dublin* se confirmó su ausencia, explicando así su incapacidad de conferir resistencia a cepas de *E. coli* sensibles (Sukupolvi *et al.*, 1992). Sukupolvi *et al.* (1990) secuenciaron *traT* del plásmido de *S. typhimurium* (que codifica para una teórica proteína de 243 aa, con un péptido señal de 20 aa

típico de lipoproteínas) observando una homología muy elevada en la secuencia de aa con TraT codificada por plásmidos tipo F.

Una segunda proteína implicada en resistencia al suero la describieron Hackett *et al.* (1987), que tras fabricar una genoteca con DNA total de una cepa de *S. typhimurium*, aislaron un clon de origen plasmídico (el cual codificaba una proteína de membrana externa), que transformado en *E. coli* y en una cepa curada de *S. typhimurium* sensibles al suero les confería fenotipo resistente. El gen responsable, denominado *rck* (*resistance complement killing*), presenta un tamaño de 555 pb, y codifica una proteína de 185 aa, de los cuales los primeros 24 constituyen el péptido señal, dando lugar a una proteína madura de 17,4 kDa (Heffeman *et al.*, 1992a). La secuencia de Rck muestra una elevada homología con una familia de proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas donde destacan PagC, requerida por *S. typhimurium* para su supervivencia en macrófagos y virulencia en ratón, y Ail, necesaria en *Yersinia enterocolitica* para la adhesión e invasión de células epiteliales. Heffeman *et al.* (1992) explican el mecanismo de acción de Rck, argumentando que Rck alteraría la configuración de las moléculas de C9, asociadas a los complejos C5b-9 situados en la superficie bacteriana, lo que afectaría a su polimerización, inhibiendo la formación e inserción de los complejos tubulares de ataque a membrana en la membrana externa de *Salmonella*.

Recientemente se han realizado ensayos para valorar la participación de las diversas proteínas de membrana externa de la familia de las enterobacterias, entre ellas Rck, PagC y Ail, en la resistencia al complemento y adhesión e invasión de células eucariotas cuando son codificadas en plásmidos multicopia en *E. coli*. En estas condiciones sólo la presencia de *rck* y *ail* aumentan la resistencia al suero y la capacidad adhesiva e invasiva. Se postula que posiblemente alguna de las regiones que muestran homología entre las proteínas correspondientes sean las responsables del fenotipo observado (Heffeman *et al.*, 1994).

Por último, Vandenbosch *et al.* (1989a) observaron que la integración del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* en el cromosoma incrementaba la susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento manteniéndose inalterada la composición del LPS. El fenotipo silvestre se recuperaba cuando estaba presente en la cepa, en un plásmido autónomo, una región plasmídica denominada *rsk* (*reduced serum killing*), no teniendo efecto alguno en cepas curadas (Vandenbosch *et al.*, 1989). El fragmento mínimo que revierte el fenotipo es de 66 pb, el cual contiene tres secuencias directas repetidas imperfectas de 10 pb separadas entre sí por otras 11 pb. Este fragmento no forma parte ni de la región codificante ni del promotor de un gen. El mecanismo de acción no es conocido, pero los autores anteriormente citados postulan que *rsk* funcionaría normalmente en el plásmido autónomo controlando la producción de una molécula reguladora de origen plasmídico. Esta molécula podría ser un represor ya que la curación del plásmido no provoca incremento en la sensibilidad al suero.

### **1.2.1.3.- *vagC/vagD*.**

Tras la realización de un experimento de mutagénesis por transposición de una cepa de *S. dublin*, portadora del plásmido de virulencia, con el fin de aislar mutantes deficientes en su virulencia en ratón, se obtuvieron además de los mutantes afectados en la región de virulencia conservada dentro de los distintos serotipos, otros en zonas distantes a la anterior (Williamson *et al.*, 1988a). De los últimos citados, el denominado G19 mostró como fenotipo asociado a la disminución de la virulencia estudiada en ratón, la incapacidad de crecer en un medio que presentaba citrato como única fuente de carbono, a diferencia tanto de la cepa silvestre como de la curada del plásmido (Lax *et al.*, 1990). Posteriormente, Pullinger y Lax (1992) procedieron a la caracterización del mutante G19 comprobando que la mutación estaba situada en un ORF de 392 nucleótidos seguido de otro posiblemente asociado transcripcionalmente al anterior de 255 nucleótidos y que fueron denominados *vagC* y *vagD* respectivamente (*virulence associated gene*), encontrándose situados detrás del sistema de resolución de multímeros (que se comentará en apartados posteriores). Así se observó que G19 en general no crecía en medios con limitación de nutrientes y las células al microscopio aparecían alargadas, sugiriendo una inhibición de la división celular. Estos autores postulan que este sistema pueda estar implicado en la coordinación entre la replicación plasmídica y la división celular. Mediante ensayos de hibridación y secuencia se comprobó que los genes *vagC/vagD* estaban ausentes en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*.

En definitiva, excepto el fenotipo de ausencia de virulencia en ratón, no se conocen datos en lo que se refiere al mecanismo de acción del sistema comentado, su regulación, y su distribución entre los plásmidos de otros serotipos.

### **1.2.2.- Otras regiones plasmídicas no implicadas en virulencia.**

En los plásmidos de virulencia de los serotipos más estudiados se han identificado progresivamente genes o grupos de genes que aparentemente en las condiciones de estudio empleadas no participan en el fenotipo de virulencia asociado al plásmido, además su función en el plásmido es desconocida en la mayoría de los casos. A continuación se describen de manera sintética los datos publicados acerca de ellos. Aún así permanecen regiones plasmídicas sin caracterizar, de tamaño variable dependiendo de cada serotipo.

#### **1.2.2.1.- IS630.**

Las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos que tienen la capacidad de insertar copias de sí mismos en plásmidos y en el genoma. Estos elementos se caracterizan por presentar en sus extremos secuencias repetidas invertidas.

Se ha descrito la presencia en el plásmido de virulencia de *S. dublin* de un elemento homólogo a la secuencia de inserción IS630 de *Shigella sonnei*, situado antes de *spvR*, denominado *orf1* y sin participación aparente en virulencia. Dentro de la secuencia de inserción se ha identificado un posible marco abierto de lectura (con sentido de transcripción opuesto a *spvR*) de 1035 pb que daría lugar a una teórica proteína de 345 aa. La secuencia aminoacídica anteriormente descrita muestra con la deducida del ORF presente en IS630 (343 aa) de *S. sonnei* (Matsutani *et al.*, 1987) un 66% de identidad y un 26% de similitud (Krause *et al.*, 1991b). También es importante destacar (desde el punto de vista evolutivo) que se ha encontrado homología de DNA entre una sonda del extremo 5' del *orf1* de *S. dublin* y plásmidos de virulencia de diversas especies del género *Yersinia* (Krause *et al.*, 1990). IS630 está relacionada con IS200, que es una secuencia de inserción altamente específica de *Salmonella* (Lam y Roth, 1983).

#### 1.2.2.2.- *tIpA*.

Mediante ensayos de expresión de proteínas en *Escherichia coli* de diversos fragmentos del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, clonados en vectores multicopia, Koski *et al.* (1992) observaron la producción, por parte de un clon que contenía una zona plasmídica situada antes de *spvR* y del supuesto *orf1* de *S. typhimurium*, de una proteína de 43 kDa a la que denominaron TIpA y que se producía en cantidades inapreciables cuando el gen estaba presente en el plásmido de virulencia en condiciones de cultivo de laboratorio. El gen codificante, *tIpA*, presenta un tamaño de 1116 pb y codifica una proteína de 371 aa, presentando una dirección de transcripción opuesta a los genes *spv*.

La estructura secundaria de TIpA muestra un extremo amino-terminal de estructura globular y el resto de la proteína prácticamente en su totalidad una conformación en hélice- $\alpha$ . TIpA purificada se encuentra de una manera mayoritaria formando homodímeros con una estructura cuaternaria en hélice- $\alpha$  enrollada ( *$\alpha$ -helical coiled coil*), procedente de la asociación de dos moléculas con estructura en hélice- $\alpha$ . La secuencia de aminoácidos de TIpA presenta regiones de homología parcial con diversas miosinas y tropomiosinas eucarióticas así como con proteínas M de *Streptococcus pyogenes*, caracterizadas por presentar una estructura en hélice- $\alpha$  enrollada. Posteriormente, mediante estudios de microscopía electrónica, se ha descrito la capacidad de TIpA de presentar un nivel de organización superior al de dímero cuando se sobreexpresa en *E. coli*; concretamente, se observaron estructuras laminares estriadas en el citoplasma como consecuencia de asociaciones de unidades de TIpA de forma lineal y lateral (Hurme *et al.*, 1994).

La función de TIpA en *Salmonella* se desconoce por el momento. Se postulan diversas hipótesis basadas en el plegamiento característico de la proteína, como su posible implicación en la partición del plásmido de virulencia, lo cual estaría en concordancia con la enorme estabilidad del mismo; además, *tIpA* se sitúa en una región plasmídica próxima a la implicada en partición

(*par*). Recientemente se ha demostrado la participación de la proteína MukB de *E. coli* (que presenta una estructura del tipo TlpA) en la segregación de los cromosomas de las células hijas durante la división celular (Niki *et al.*, 1991). También se postula que TlpA pueda intervenir en algún tipo de interacción con las células huésped cuando *Salmonella* se encuentra en un estadio intracelular. Finalmente, es importante destacar que de las proteínas bacterianas descritas hasta la fecha con la estructura cuaternaria similar a la de TlpA, una de ellas está claramente implicada en virulencia; así, las proteínas M de *S. pyogenes* se presentan cubriendo la superficie de la bacteria incrementando su virulencia (Fischetti, 1989).

### 1.2.2.3.- Región de genes de transferencia (*tra*).

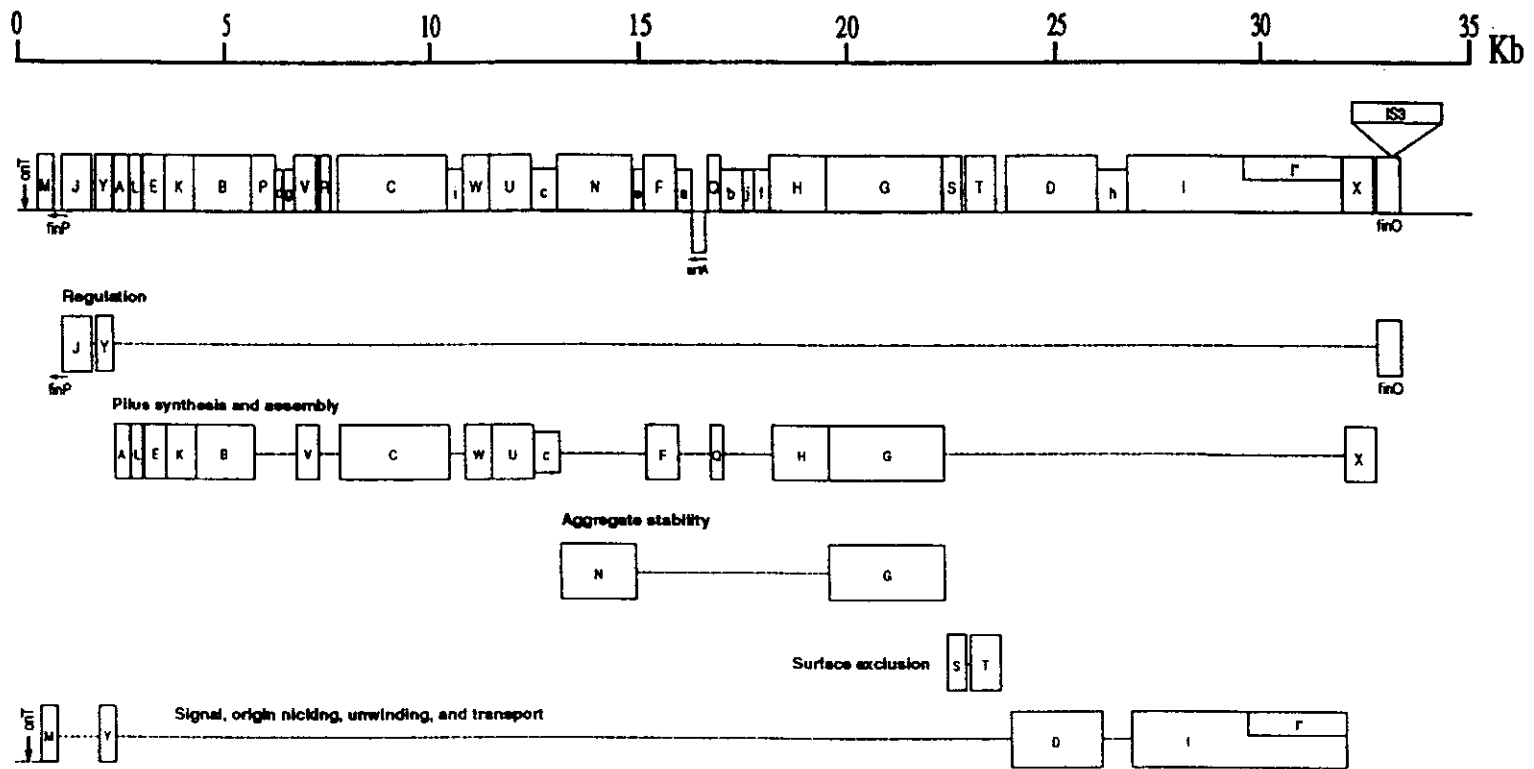
Recibe este nombre la región de ciertos plásmidos de virulencia de *Salmonella* donde se han descrito homologías con zonas implicadas en procesos conjugativos de diversos plásmidos del complejo IncF, en los cuales los genes que ocupan dicha región han sido denominados genes de transferencia o *tra*. La parte donde se situarían los teóricos genes *tra* de los plásmidos de virulencia es la menos estudiada, pudiendo, sin embargo, aportar valiosa información sobre la genealogía de los mismos. Se desconoce en todos los casos cuales son los genes presentes, a excepción de *traT* y del origen de transferencia *oriT*.

Los plásmidos de virulencia pertenecientes a los serotipos más caracterizados no presentan capacidad conjugativa (Ou *et al.*, 1994; Sukupolvi *et al.*, 1990; Terakado *et al.*, 1988), lo que indicaría la posible ausencia de ciertos genes del operón de transferencia. El paradigma de procesos conjugativos es el plásmido F (factor de fertilidad) de *E. coli* K-12, del grupo de incompatibilidad IncFI, que presenta un tamaño aproximado de 100 kb, de las cuales 33,3 kb están ocupadas por los genes de transferencia. La conjugación es un proceso por el cual el DNA es transferido de una bacteria a otra, y requiere el contacto entre célula donadora y receptora (Ippenlhler y Minkley, 1986). La transferencia de DNA se inicia en un lugar específico denominado *oriT* o *nic*, en respuesta a una señal todavía no identificada. A través de un filamento extracelular, denominado "*pilus F*", expresado por la región de transferencia de la célula portadora del plásmido conjugativo, se crea un contacto específico con la célula receptora conduciendo a la formación de lo que se denomina agregado. Una vez que el agregado se encuentra estabilizado, se transfiere una de las cadenas del DNA en dirección 5'→3', comenzando desde el origen de transferencia y pasando en último lugar la propia región de transferencia. El proceso completo de transferencia del plásmido F tiene lugar en 5 minutos. A continuación se lleva a cabo la recircularización de la cadena transferida y la síntesis de la cadena complementaria a la existente, tanto en la célula donadora como receptora; a partir de este momento las células presentan capacidad conjugativa.

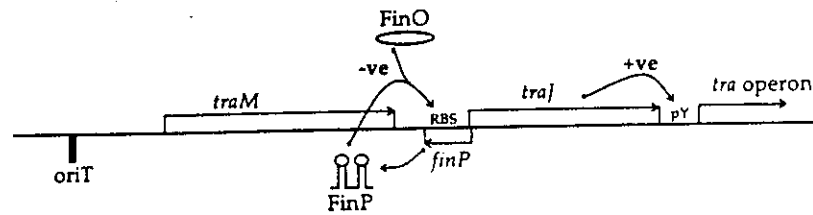
Aunque en los últimos años se está profundizando en el conocimiento de diversos procesos conjugativos, como los debidos a los plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncI, IncP, IncN e IncW, el plásmido F se ha constituido en el plásmido conjugativo más estudiado, y de hecho es

el único plásmido del grupo de incompatibilidad IncF cuya región de transferencia ha sido totalmente secuenciada. Aún así existen múltiples incógnitas por explicar. Igualmente se han secuenciado diversos fragmentos pertenecientes a regiones *tra* de otros plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncF. En la mayoría de los casos estudiados estas regiones presentan un elevado porcentaje de homología entre ellas y con F, pero se observan divergencias en ciertos genes (aunque claramente procedentes de un ancestro común) siendo este hecho el que marca la especificidad en los procesos de transferencia de estos plásmidos (Frost *et al.*, 1994). Se han elaborado grupos de complementación con diversos genes de la región de transferencia de los plásmidos conjugativos IncF, según su capacidad para ser intercambiados sin verse alterada su función, destacando los descritos para *oriT*, *finO*, *finP*, *traJ*, *traY*, *traA* y genes implicados en el proceso de exclusión de superficie (Willetts y Maule, 1985).

Debido al escaso conocimiento de la región de transferencia de la mayoría de los plásmidos conjugativos IncF en comparación con los disponibles del plásmido F, los datos citados a continuación se referirán a este último. Las proteínas codificadas por los diversos genes descritos se han englobado en cinco grupos teniendo en cuenta su función (Frost *et al.*, 1994) (Figura 1.2). Diversos estudios han identificado promotores independientes para *traM*, *J*, *S*, *T*, *D*, *I* y *trbF*; siendo el promotor principal el situado antes de *traY* denominado Py, que da lugar a un RNA mensajero que incluye desde *traY* hasta *traI*, por lo que a Py se le ha llamado el promotor del operón *tra*. Cabe destacar que algunos de los ORFs presentes en el operón *tra* todavía permanecen sin función conocida en el proceso de transferencia. Se están realizando estudios *in vitro* para aclarar como se realiza el control del proceso de transferencia; así, se ha propuesto un modelo que explica como se regula la expresión desde Py, donde la región reguladora estaría compuesta por *traJ*, *finP* y Py. De manera resumida, TraJ es requerida para la iniciación de una intensa transcripción desde el promotor Py, mientras *finP* regula negativamente la expresión de TraJ en presencia del producto del gen *finO* situado en el extremo final de la región de transferencia. De esta forma *finP* codifica un RNA antisentido que es transcrito constitutivamente y que en ausencia de FinO es degradado rápidamente por una actividad ribonucleasa celular; como resultado, el RNAm procedente de *traJ* está libre para unirse a los ribosomas y traducirse a proteína dando lugar a la activación de la transcripción del operón *tra* desde Py. Sin embargo si FinO está presente en la célula, su unión a FinP evita su degradación, haciendo posible su interacción con la zona de unión a ribosomas del RNAm de *traJ* evitando su traducción y por ende la activación del operón (van Biesen.T. y Frost, 1994) (Figura 1.3). Debido a este sistema de control, existe una regulación del proceso de conjugación en los plásmidos de tipo F que presentan este sistema; sin embargo, el gen *finO* del plásmido F se encuentra interrumpido por una secuencia de inserción (IS3) impidiendo su funcionalidad y por tanto dando lugar a la expresión constitutiva de TraJ (Yoshioka *et al.*, 1987).



**Figura 1.2.-** Representación de la región de transferencia del plásmido F de *E. coli*. Salvo cuando se indica lo contrario (con una flecha) la dirección de transcripción es de izquierda a derecha. Los genes indicados en letra mayúscula corresponden a genes *tra*, mientras que los que se muestran en minúscula corresponden a *trb*. Los diversos genes aparecen agrupados por la función de la proteína que codifican (cuando este dato es conocido) (Frost *et al.*, 1994).



**Figura 1.3.-** Modelo propuesto de regulación del operón *tra* del plásmido F. Regulación positiva (+ve) y negativa (-ve) (van Biesen.T. y Frost, 1994).

Como se indicó en un punto anterior, al hacer referencia a genes plasmídicos relacionados con la resistencia a la acción lítica del complemento, uno de los genes descritos fue *traT*. En los primeros estudios donde se describe la presencia en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* de un gen homólogo al gen *traT* de operones de transferencia no se plantea la posibilidad de la existencia de más genes *tra* en el plásmido, en base a la ausencia de actividad conjugativa descrita para este (Sukupolvi *et al.*, 1990). Es importante destacar que el incremento de la resistencia al suero producido por la proteína de membrana externa TraT se puede considerar un efecto colateral frente a su función principal en los procesos de transferencia que radica en ser la responsable junto al producto del gen *traS* del fenómeno denominado exclusión de superficie, que consiste en producir un bloqueo de la conjugación entre bacterias que portan plásmidos relacionados (concretamente, del mismo grupo de exclusión) (Frost *et al.*, 1994). Se han llevado a cabo ensayos de hibridación empleando como sonda un fragmento interno del gen *traT* del plásmido de *S. typhimurium* con el fin de valorar su distribución en distintos serotipos de *Salmonella*; encontrándose secuencias relacionadas en *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*, y estando ausente en *S. dublin* (Sukupolvi *et al.*, 1992; Korpela *et al.*, 1989). Recientemente han aparecido datos que indican la existencia de homología entre el plásmido de *S. pullorum* y genes *tra* del plásmido F; además, empleando una sonda del *oriT* del plásmido F se han observado distintos grados de homología con los plásmidos de *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. gallinarum*, siendo los resultados totalmente negativos con los de *S. dublin* y *S. choleraesuis* (Ou *et al.*, 1994).

Volviendo de nuevo sobre la región de transferencia, ésta puede ser definida como la zona comprendida entre el origen de transferencia (*oriT*) y el final de *finO*. Las regiones flanqueantes están conservadas entre los plásmidos IncF estudiados y probablemente tengan o hallan podido tener un papel en la transferencia plasmídica. De esta forma, detrás de *finO* se han localizado dos

genes denominados *orfB* y *orfA*, los cuales han sido completamente secuenciados en el plásmido R100 y parcialmente en F; las secuencias descritas para *orfB* presentan gran homología mientras las de *orfA* divergen, además se ha observado que el producto de *orfA* presenta un potencial péptido señal y este gen parece ser dispensable para el proceso de transferencia (Yoshioka *et al.*, 1990). El producto de *orfA* se ha relacionado con una familia de nucleasas (Frost *et al.*, 1994), incluyendo las de *Staphylococcus aureus* (Cotton *et al.*, 1979), y la de los plásmidos pSa (Close y Kado, 1992) y RP4 (Gerlitz *et al.*, 1990).

Otro ejemplo de plásmido conjugativo que presenta una endonucleasa posiblemente relacionada con el proceso de transferencia es el plásmido pKM101, que pertenece al grupo de incompatibilidad IncN (por tanto no relacionado con F). pKM101 tiene un tamaño de 35,4 kb y se formó a partir del plásmido R46 (procedente de un aislado clínico) de 49,3 kb por una deleción de aproximadamente 14 kb (región codificante fundamentalmente de resistencias frente a ciertos antibióticos) sufrida tras manipulaciones de laboratorio (Langer y Walker, 1981). Este plásmido ha sido ampliamente estudiado por presentar la propiedad de hacer a *E. coli* y *S. typhimurium* más resistentes a los efectos letales de la radiación ultravioleta y por incrementar su susceptibilidad a la mutagénesis por diversos agentes químicos (Langer y Walker, 1981). Lackey *et al.* (1977) detectaron la producción de una endonucleasa por cepas de *S. typhimurium* que contenían el plásmido pKM101, que presentaba como características una actividad ATP-independiente, degradaba con igual eficiencia DNA de cadena doble y sencilla generando extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato, no presentaba actividad exonucleolítica detectable y su actividad era máxima en presencia de cationes divalentes, siéndole asignado un tamaño de 75 kDa. Recientemente se ha descrito que la proteína (Nuc) madura tiene un tamaño de 17 kDa (Pohlman *et al.*, 1993). Esto sugiere que la proteína presenta una estructura cuaternaria tetramérica, para aproximarse a los valores de tamaño de la proteína detectados en estudios anteriores. Se ha comprobado que está localizada en el periplasma y que la actividad nucleasa presenta la propiedad de ser EDTA-resistente; sin embargo, no se ha logrado asignarle ninguna función (siendo dispensable en el proceso de conjugación, entre otros). Realizando estudios con diversos plásmidos pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad se detectó que la producción de endonucleasas EDTA-resistentes se encontraba circunscrito a ciertos grupos de incompatibilidad (de los ensayados) como IncI, N, H y M (Winans y Walker, 1983).

El sistema de conjugación de pKM101 está compuesto por tres agrupaciones de genes *tra*, a diferencia de la estructura continua presente en el plásmido F, situándose *nuc* en una región intermedia entre dos regiones *tra* (Winans y Walker, 1985). La secuencia deducida de aminoácidos presenta los primeros 20 aa con características de péptido señal (como era esperable debido a su localización periplásmica). Tras la sobreexpresión (fusionando *nuc* a un promotor fuerte) y purificación de Nuc, en ensayos realizados sobre DNA, para caracterizar su patrón de corte, no mostró secuencia específica de reconocimiento. Por otro lado, no se conoce la función

en la célula de esta proteína (Pohlman *et al.*, 1993). Estos mismos autores comprobaron que *nuc* se encuentra en pKM101 inmediatamente detrás del gen *traG* y la región carboxilo-terminal de su producto presentó homología con la secuencia de aa deducida de un ORF parcialmente secuenciado del plásmido Collb-P9 (Incl) (Strack *et al.*, 1992). En este último plásmido citado se ha descrito la producción de una nucleasa EDTA-resistente por un gen situado entre dos agrupaciones de genes *tra* (Rees *et al.*, 1987). Los datos presentados parecen sugerir que esta enzima participara ancestralmente en conjugación o procesos relacionados.

#### 1.2.2.4.- Genes relacionados con la estabilidad y replicación plasmídica.

Entre los mecanismos implicados en la perpetuación, en sucesivas generaciones, de plásmidos de gran tamaño y bajo número de copias se encuentran la existencia de múltiples replicones y regiones relacionadas con partición (distribución de copias plasmídicas a las células hijas en la división celular). Es importante destacar que debido a la acción conjunta de diversos sistemas de estabilización el plásmido de virulencia de *Salmonella* es extremadamente estable.

Los estudios realizados acerca del sistema de replicación del plásmido de virulencia de *Salmonella* se encuentran todavía en una fase inicial. Michiels *et al.* (1987) fueron los primeros en describir y situar de una manera aproximada dos zonas (denominadas *repA* y *repB*) que mostraban una posible participación en procesos de replicación en el plásmido de *S. typhimurium*, después de realizar un análisis fenotípico de sucesivas deleciones. Más tarde se realizaron estudios en profundidad para delimitar los replicones presentes en el plásmido de *S. typhimurium*, y para ello se clonaron diversos fragmentos plasmídicos obtenidos mediante restricciones parciales en un vector carente de capacidad autoreplicativa; de esta manera se aislaron dos regiones que contendrían un posible replicón. Uno de ellos correspondió a *repB*, anteriormente descrito por Michiels *et al.* (1987) y situado en las proximidades de *traT*; sin embargo, el otro (denominado *repC*) no correspondía al descrito como *repA* por Michiels *et al.* (1987) y se localizó en un fragmento *Bgl*II de 3,2 kb posterior al operón *spv*. Estos replicones dan lugar a 2-3 copias plasmídicas por cromosoma, y se ha detectado una hibridación débil de *repB* con el plásmido R100 (IncFII) y de *repC* con el plásmido F (IncFI). De ambos replicones, *repB* es más estable que *repC* de manera aislada, pero sin alcanzar la estabilidad del plásmido parental (Tinge y Curtiss III, 1990a). Así mismo, se han realizado ensayos de hibridación empleando como sonda fragmentos internos de *repA* y *repB* del plásmido de *S. typhimurium* para determinar su distribución entre distintos serotipos de *Salmonella*. Se ha observado su presencia en cepas de *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* y *S. pullorum* mientras que en *S. dublin*, *S. gallinarum* y *S. pullorum* no se ha detectado hibridación con la sonda procedente de *repC*. Es importante resaltar la ausencia de ambos replicones en otros 30 serotipos de *Salmonella* analizados (Tinge y Curtiss III, 1990).

Los plásmidos bacterianos que normalmente se encuentran en la naturaleza son mantenidos por las sucesivas generaciones con una elevada fidelidad. Pueden agruparse dentro de dos grandes tipos: los que se presentan en un elevado número de copias por célula y los de bajo número de copias. En los primeros su distribución en las células hijas se realizaría al azar, garantizando su alto número de copias una probabilidad baja de generación de células sin plásmido. Sin embargo, en el segundo caso, como sería el plásmido de virulencia de *Salmonella*, son necesarios distintos mecanismos que, actuando individualmente o en combinación, prevengan la formación de células libres de plásmido tras la división celular. En los plásmidos de virulencia de *Salmonella* se han descrito dos de estos sistemas, como son la región de partición (*par*) y un sistema de resolución de multímeros.

Fueron Krause *et al.* (1991a) los primeros en advertir en un estudio de acotamiento de la región *spv* del plásmido de virulencia pSDL2 de *S. dublin*, que la delección de una zona situada a continuación del operón *spv* producía un incremento de la inestabilidad del plásmido, apareciendo formas multiméricas. Posteriormente, tras el estudio y secuenciación de la región responsable, se observaron dos elementos fundamentales, un ORF que codificaba una proteína con actividad resolvasa (*rsd*) que actuaba en *trans* y un lugar de resolución en *cis* (*crs*). La proteína Rsd de 28,7 kDa codificada por este ORF (780 pb) presenta un extremo carboxilo-terminal semejante al consenso de resolvasas sitio-específicas de la familia de las integrasas (Krause y Guiney, 1991). Rsd presenta una identidad del 84% con la proteína D, recombinasa del plásmido F (Lane *et al.*, 1986). El gen *rsd* presenta una dirección de transcripción opuesta al operón *spv*. El sitio *crs*, situado antes de *rsd*, consta de ocho repeticiones directas incompletas de 17 pb, seguidas de una región con varias repeticiones ricas en GC homólogas al origen de replicación (*oriV1*) del plásmido F; no obstante no participa en funciones de replicación. Estos mismos autores detectaron actividad resolvasa en todas las cepas portadoras de plásmido de virulencia que ensayaron; concretamente en *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. gallinarum* y *S. choleraesuis*. La resolvasa se une a las secuencias *crs* de los multímeros formados y por recombinación sitio-específica regenera los monómeros. En definitiva, el sistema de resolución de multímeros actúa aumentando el número de moléculas plasmídicas (monoméricas) disponibles para su distribución en la división celular.

Los sistemas de partición juegan un papel importante en la estabilidad de plásmidos de bajo número de copias, puesto que van a controlar el reparto de las moléculas plasmídicas en el momento de la división celular (Austin, 1988). Inicialmente se describió la existencia en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* de una región de 4,3 kb, situada tras *t1pA*, que presentaba funciones de incompatibilidad y partición (Cerin y Hackett, 1989). Poco después, Tinge y Curtiss III (1990a) aislaron una zona del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* que presentó la propiedad de estabilizar replicones heterólogos, incrementando la estabilidad segregacional del plásmido que la contiene, y que fue denominada *par*. La zona responsable se sitúa en el plásmido de *S. typhimurium* coincidiendo con la posición donde Michiels *et al.* (1987) situaron *repA*. La

región *par* codifica dos proteínas, ParA y ParB. Tras secuenciar las 4,3 kb anteriormente reseñadas que incluían la región definitivamente denominada *parVP* (*par Virulence Plasmid*), se describieron dos lugares implicados en incompatibilidad y partición, *incR* e *incL* (*parS*) y entre ellos dos genes *parA* y *parB* con funciones en partición. Estos genes muestran homología con secuencias de los genes *par* presentes en otros plásmidos y codifican proteínas de 40 y 32,5 kDa respectivamente (Cerin y Hackett, 1993).

En el plásmido de virulencia de *Salmonella* es necesaria la presencia de *incR* e *incL* para la expresión del fenotipo de incompatibilidad, mientras que presenta dos sistemas de partición relacionados, uno en el que intervendrían *parA*, *parB* y *parS* y otro compuesto por *parA* e *incR*. Una propiedad de esta región del plásmido de virulencia, a diferencia de regiones *par* de otros plásmidos, consiste en que la transcripción de *parA* y *parB* se realiza de forma independiente presentando promotores autónomos.

Por otra parte, Tinge y Curtiss (1990), han detectado mediante ensayos de hibridación regiones homólogas a *parVP* en los plásmidos de virulencia de *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. dublin*, si bien la hibridación con el último fue débil.

#### 1.2.2.5.- Operón *samAB*.

El tratamiento de las bacterias con diversos mutágenos, entre los que se encuentran las radiaciones ultravioleta, rayos-X, y agentes químicos que dañan de alguna forma el DNA, genera una respuesta celular denominada SOS, que se expresa transitoriamente e incluye reparación de daños por excisión de secuencias, recombinación, mutagénesis e inhibición del crecimiento celular. Esta respuesta da lugar a la expresión de al menos 20 genes entre los que se encuentran *umuD*, *recA* y *lexA*. En el caso de la mutagénesis producida como consecuencia del proceso de reparación del DNA, se produce un incremento en la supervivencia celular mediada por el operón *umuDC* (Woodgate y Sedgwick, 1992) a expensas de una disminución de la fidelidad de la copia. Hasta el momento se han caracterizado en profundidad cinco operones del tipo *umuDC*: *samAB* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Nohmi *et al.*, 1991), *umuDC<sub>ST</sub>* cromosómico de *S. typhimurium* (Thomas *et al.*, 1990), *mucAB* del plásmido pKM101 (Perry *et al.*, 1985), *impCAB* del plásmido TP110 (Lodwick *et al.*, 1990) y el cromosómico *umuDC* de *E. coli* (Kitagawa *et al.*, 1985).

El represor LexA regula de manera negativa la transcripción de los genes implicados en la respuesta SOS mediante su unión a una secuencia específica de la zona promotora conocida como "caja SOS". Cuando se produce un daño en el DNA, el represor LexA sufre un corte proteolítico mediante su interacción con un complejo formado por la proteína RecA, DNA de cadena sencilla y ATP, permitiendo la expresión de los genes que estaban bajo el control de LexA.

Los genes *umu* están estructurados en forma de operón que incluye dos genes que codifican proteínas de tamaño similar en todos los casos citados (Woodgate y Sedgwick, 1992), salvo en el

del plásmido TP110 donde el operón está formado por tres genes. Mutantes *umuDC* de *E. coli* muestran una disminución en la tasa de mutación provocada por la exposición a radiaciones ultravioleta y ciertos agentes químicos. De cualquier forma, es importante destacar que *S. typhimurium* es menos mutable por estos agentes que *E. coli*, y sin embargo presenta un operón *umuDC* altamente homólogo al de esta bacteria (Thomas *et al.*, 1990).

Fueron Nohmi *et al.* (1991) quienes, realizando un ensayo de complementación de la mutación *umuC122* de una cepa de *E. coli* por transformación con una genoteca (en plásmido multicopia) de *S. typhimurium*, aislaron una serie de clones que complementaban el defecto en mutagénesis después del tratamiento con radiación ultravioleta. Comprobaron por hibridación que uno de ellos pertenecía al plásmido de virulencia, y observaron que la región responsable del fenotipo estaba compuesta por dos marcos abiertos de lectura de 420 y 1272 pb, denominados *samA* y *samB*. Estos codifican unas proteínas de 140 aa (15,5 kDa) y 424 aa (47,7 kb) respectivamente. Los genes *samA* y *samB*, al igual que *umuD* y *umuC* de *E. coli*, se encuentran solapados por un nucleótido. El operón *samAB* se encuentra situado en el plásmido de virulencia a continuación de la región *par*. La homología en la secuencia de nucleótidos entre *samAB* y *umuDC<sub>ST</sub>* es de un 60% y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas presentan una homología del 49% con UmuD y del 63% con UmuC; esto indica que el operón plasmídico y el cromosómico son homólogos pero diferentes. Sin embargo, *samAB* presenta la mayor homología con el operón *impCAB* del plásmido TP110 (66% en DNA y 60-70% en proteína).

Se ha demostrado mediante la interrupción de los genes integrantes de *samAB* y *umuDC<sub>ST</sub>* que estos operones no son esenciales para la viabilidad bacteriana. La participación del operón *samAB* en la mutagénesis de *S. typhimurium* provocada por tratamiento con radiación ultravioleta ha sido ensayada realizando una batería de experimentos con cepas isogénicas de *S. typhimurium* portadoras de distintas mutaciones en los cuatro genes *umu* presentes en las células. Se comprobó que en la ausencia de operón cromosómico funcional, *samAB* (en el plásmido de virulencia) era incapaz de complementar el fenotipo de disminución en la mutagénesis observada (cuantificándose como revertientes de la mutación *leuD21*) (Koch *et al.*, 1992). De igual forma, Nohmi *et al.* (1992) no observaron alteración alguna del fenotipo asociado a los genes *umu* tras la curación del plásmido de virulencia de una cepa de *S. typhimurium*. Se ha comprobado mediante *northern blot*, empleando como sonda oligonucleótidos marcados pertenecientes a *samA* y *samB*, que se produce la transcripción de dichos genes después de la inducción de una lesión en el DNA, lo que teóricamente apunta a que la deficiencia funcional observada no es causada por una falta de expresión (Koch *et al.*, 1992). Recientemente, en experimentos realizados sobre el gen *hisD* de *S. typhimurium*, se ha comprobado que el operón *umuDC<sub>ST</sub>* está implicado en la mutagénesis debida al tratamiento celular con ciertos agentes químicos, que provocan mutaciones por corrimiento del marco de lectura debido a deleciones CG, mientras que *samAB* no ha mostrado ningún tipo de participación (Nohmi *et al.*, 1995).

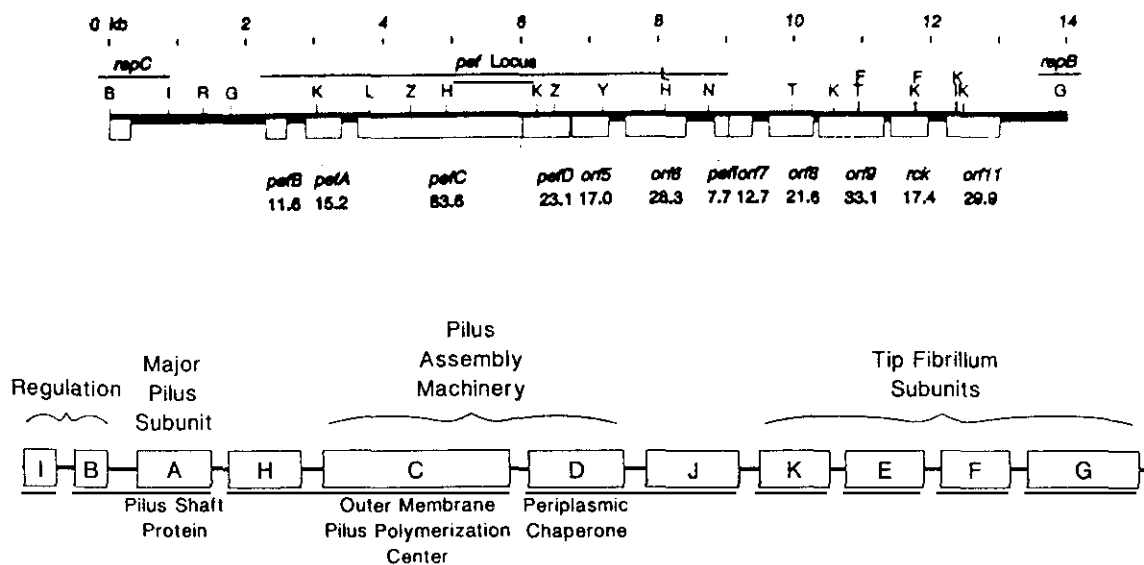
La cuestión acerca de la aparente falta de funcionalidad del operón *samAB* permanece en discusión. Se han llevado a cabo hibridaciones DNA-DNA empleando como sonda los genes *umu* de *E. coli*, observándose su amplia distribución dentro de las enterobacterias; sin embargo, en algún caso no está directamente relacionada con la aparición del fenotipo propio debido a los productos del operón *umu*. Como dato interesante se pueden citar las enormes diferencias observadas (hasta 200 veces) en la tasa de mutagénesis inducida por tratamientos lesivos del DNA dentro de los diferentes miembros de las enterobacterias, e incluso dentro del mismo género, como en *Escherichia*. Por todo ello se postula que los genes tipo *umu* presenten ventajas adicionales para las células que los portan y por ello hayan sido conservados durante el proceso de evolución (Sedgwick *et al.*, 1991). De manera sorprendente, mediante ensayos de hibridación DNA-DNA empleando como sonda los genes *umu* cromosómicos de *S. typhimurium*, no se han detectado secuencias homólogas en DNA procedente de cepas de *S. enteritidis* (Stanley *et al.*, 1992).

#### 1.2.2.6.- Región implicada en síntesis de fimbrias (*pef*).

La caracterización de la zona plasmídica que incluye los denominados genes *pef* se inició de una manera casual al realizar un estudio de complementación con una genoteca de *S. typhimurium* de mutantes de *E. coli* deficientes en el sistema especializado de transporte de vitamina B<sub>12</sub> y otras cobalaminas a través de la membrana externa. Se obtuvieron transformantes con el fenotipo parcialmente complementado. Posteriormente se comprobó por hibridación que la secuencia de DNA responsable procedía del plásmido de virulencia y que en las cepas transformadas aparecía en su membrana externa una nueva proteína (teóricamente responsable de la complementación) de aproximadamente 84 kDa (Rioux y Kadner, 1989). En ensayos de expresión de proteínas se detectaron cinco polipéptidos, entre ellos uno de 84 kDa. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida que mostró una elevada similitud con las proteínas de membrana externa PapC y FaeD de *E. coli*, que forman parte de operones de fimbrias. Esto puso de manifiesto que posiblemente la sobreexpresión de esta proteína de membrana externa diera lugar a una perturbación de la misma, permitiendo el paso de cobalaminas (Rioux *et al.*, 1990). Debido a que los resultados anteriores apoyaban la posibilidad de la existencia en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* de un sistema de síntesis de fimbrias, Friedrich *et al.* (1993) decidieron caracterizar un fragmento plasmídico que contenía la secuencia codificante de la proteína de membrana externa previamente descrita. Para ello llevaron a cabo la secuenciación de las 13,9 kb situadas exactamente entre los replicones *repB* y *repC*. Del análisis de la secuencia obtenida se dedujo la existencia de 13 ORFs teóricos de un tamaño superior a 100 codones y con la misma dirección de transcripción, de *repC* a *repB*. La comparación en bancos de secuencias de las posibles secuencias de aminoácidos deducidas de

estos ORFs permitió diferenciar una primera zona que abarcaba 2,3 kb y contenía la parte final de *repC*, seguida de otra de 2 kb que presentaba homología con algunos orígenes de replicación, pero sin codificar polipéptidos de tamaño significativo.

A partir de las primeras 2,3 kb de secuencia se extienden diversas regiones codificantes relacionadas, a nivel proteico, con componentes integrantes de operones de síntesis de fimbrias, fundamentalmente de *E. coli*, destacando los *pap* de *E. coli* patógenos de vías urinarias (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993; Krogfelt, 1991; Hultgren y Normark, 1991) y *fae* y *fan*, importantes en la colonización del epitelio intestinal (De Graaf, 1990), que serán a los que nos referiremos a partir de este momento. A estos ORFs se les asignó la denominación de *pef* (*plasmid-encoded-fimbriae*) y la designación específica de cada gen se realizó teniendo en cuenta la nomenclatura de las proteínas homólogas codificadas por el operón *pap*, cuya organización génica se muestra en la Figura 1.4.



**Figura 1.4.-** Arriba: Representación de la distribución de los ORFs descritos por Friedrich *et al.* (1993) en la secuencia de 13,9 kb perteneciente al plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Se indica junto al nombre de cada gen el tamaño en kDa de la correspondiente proteína deducida de la secuencia nucleotídica. Abajo: Representación de la estructura del operón de síntesis de fimbrias *pap* de *E. coli*, indicándose las funciones asignadas a algunos de los genes (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993).

De esta forma, el primer gen descrito fue *pefB* (303 pb) cuya secuencia deducida de aminoácidos, PefB, es homóloga a diversas proteínas reguladoras de operones de fimbrias, entre las que destacan PapB (47%) y FanB (32%). A continuación se encontró *pefA* (519 pb), que presenta una secuencia deducida de aminoácidos, PefA, con una homología de un 30% con FanC y 19% con PapA, todas ellas subunidades de fimbrias.

La secuencia aminoacídica deducida del siguiente ORF denominado *pefC* (2409 pb) mostró un porcentaje de homología de un 24% con PapC, (29%) FanD y (32%) FaeD que actúan como plataforma de ensamblaje o centro de polimerización de los componentes de la fimbria.

Inmediatamente después se sitúa *pefD* (684 pb) siendo la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos homóloga a PapD 31%, FanE 48% y FaeE 36%, que muestran función de chaperonas periplásmicas. A continuación se encuentran dos ORFs, cuyos teóricos productos no mostraron en banco de secuencias homología alguna, y recibieron la denominación genérica de *orf5* (558 pb) y *orf6* (888 pb). Curiosamente, en el operón *pap* y relacionados, *papI* y sus homólogos están situados al principio del operón y su transcripción es opuesta a la de *papB* y a la del resto de genes, mientras que *pefI* se transcribe en la misma dirección que el resto de genes *pef* y está localizado en el extremo final del teórico operón. La secuencia de aminoácidos deducida de *pefI* (213 pb) presentó homología con la proteína reguladora PapI (29%).

A partir de este punto ninguno de los productos deducidos de los ORFs presentó homología alguna con proteínas implicadas en síntesis de fimbrias. Los siguientes ORFs fueron denominados *orf7* (351 pb), *orf8* (654 pb), *orf9* (975 pb) y *orf11* (753 pb), estando localizado el gen *rock* entre el *orf9* y *orf11*. Los productos deducidos del *orf7* y *orf11* están relacionados con proteínas de actividad reguladora transcripcional, mientras que los correspondientes a *orf8* y *orf9* no muestran homología con secuencia alguna depositada en bancos de datos. En la Figura 1.4 se representa la distribución de todos los ORFs comentados anteriormente.

Estos mismos autores observaron por microscopía electrónica en cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*, transformadas con el plásmido que contenía la región íntegra de 13,9 kb, la aparición en su superficie de una cantidad elevada de fimbrias. Mediante mutagénesis por transposición del fragmento estudiado se comprobó que la interrupción de manera individualizada de *pefA*, *pefC*, *orf5* y *orf6* afecta negativamente a la producción de fimbrias, no viéndose alterada por la interrupción del *orf8*. Normalmente las fimbrias presentan en su composición una adhesina que se une, según el caso, a receptores específicos y que presenta la capacidad de provocar hemaglutinación de diversos tipos de eritrocitos. Hay que destacar que en el caso de *E. coli* portando la región *pef* y ensayando su actividad sobre eritrocitos de diversos orígenes no se observó en ningún caso aglutinación, pudiéndose explicar este hecho por la ausencia en la región *pef* de una posible adhesina o por que utilizaran otro receptor distinto para la adhesión.

Además del particular sistema de síntesis de fimbrias descrito en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, es importante destacar que en *Salmonella* se conocen cuatro genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* y *sefD*, responsables de la síntesis de subunidades de fimbrias. Las fimbrias tipo 1, en *S. enteritidis* llamadas SEF21, (codificadas por *fimA*) son comunes en enterobacterias (Rossolini *et al.*, 1993; Clegg y Gerlach, 1987), y de igual forma sucede con SEF18 (*sefD*) (Clouthier *et al.*, 1994). Sin embargo, en el caso de SEF17 (*agfA*) su distribución está prácticamente restringida al género *Salmonella*, como se ha podido observar mediante ensayos de hibridación empleando

como sonda *agfA* (Doran *et al.*, 1993). Y finalmente, como caso más exclusivo se puede citar SEF14 (*sefA*), que únicamente se ha localizado en siete serotipos de *Salmonella*, entre los que se encuentran *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. typhi* (Clouthier *et al.*, 1993; Turcotte y Woodward, 1993). Así mismo, se ha detectado la producción de fimbrias tipo 2 y 3 por ciertos serotipos de *Salmonella* mediante estudios de reconocimiento de receptores específicos y técnicas inmunológicas (Tarkkanen *et al.*, 1990; Clegg y Gerlach, 1987). También se ha descrito en ciertos serotipos la posible presencia de fimbrias tipo 4 (Sohel *et al.*, 1993), y recientemente se ha clonado un posible operón de fimbrias procedente de *S. typhimurium*, denominado *lpf*, que se ha mostrado capaz de producir fimbrias en *E. coli* (Bäumler y Heffron, 1995).

El estudio de mutantes de *Salmonella* ha confirmado la importancia de las fimbrias (y también de los flagelos) en la infección experimental (Satta *et al.*, 1993; Curtiss III *et al.*, 1993), pero no se han definido con exactitud la contribución de las diferentes adhesinas.

### **1.3.- Familia Dsb de proteínas con actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro en periplasma de bacterias.**

Los puentes disulfuro tienen un papel importante en la estructura, plegamiento y estabilidad de muchas proteínas. Aunque estas pueden formar puentes disulfuro espontáneamente en presencia de oxígeno, este proceso *in vitro* es normalmente lento y propenso a errores (pudiendo alargarse desde horas hasta incluso días). Por el contrario, *in vivo* es generalmente rápido y preciso (llevándose a cabo en segundos) (Bardwell, 1994). Desde la perspectiva del crecimiento celular es clara la necesidad de que las proteínas sean capaces de adquirir su conformación definitiva (activa) lo más rápidamente posible. Se han encontrado catalizadores que incrementan la tasa de formación de puentes disulfuro tanto en células eucariotas como procariontas. Sin embargo, se sabe relativamente poco acerca del mecanismo de formación de puentes disulfuro *in vivo*. Estudios realizados en *E. coli* han mostrado que las proteínas de exportación no adquieren su plegamiento definitivo antes de su translocación a través de la membrana citoplásmica (Kunamoto, 1991; Schatz y Beckwith, 1990).

Todos estos datos impulsaron a diversos grupos de investigación a plantearse el estudio de los factores implicados en los procesos de plegamiento de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias Gram negativas. Mediante aproximaciones experimentales diferentes, dos laboratorios clonaron un gen de *E. coli* que mostraba participación en la formación de manera eficaz de puentes disulfuro de diversas proteínas en el periplasma. Bardwell *et al.* (1991), seleccionando factores implicados en la inserción de proteínas en membrana citoplásmica, aislaron de manera fortuita un mutante defectivo en la formación de puentes disulfuro en periplasma. El gen afectado fue denominado *dsbA* (*disulphide bond formation*), y en la secuencia de aminoácidos deducida del correspondiente marco abierto de lectura se localizó una zona homóloga al centro activo consenso

de proteínas con actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro Cys-X-X-Cys (Holmgren, 1989) como la tiorredoxina (Trx), glutarredoxina (Grx) o la disulfuro isomerasa de eucariotas (PDI), no mostrando el resto de la proteína homología representativa con alguna otra depositada en bancos de secuencias. Tras la sobreexpresión de la correspondiente proteína (208 aa, incluyendo un péptido señal de 19 aa) se le estimó un tamaño de aproximadamente 21 kDa en su forma madura y se la localizó en la fracción celular correspondiente al periplasma. La inactivación de *dsbA* no afecta de manera aparente a la viabilidad celular (indicando su no esencialidad); no obstante, los fenotipos más claros de los mutantes *dsbA* fueron una disminución de la actividad enzimática fosfatasa alcalina, un defecto en el ensamblaje del *pili* tipo F y la falta de formación de puentes disulfuro en ciertas proteínas de exportación. De todas formas, en los casos citados la inactivación de *dsbA* no conduce a la falta total de formación de puentes disulfuro. Por otra parte, la proteína purificada en presencia del agente reductor ditioneitol (DTT) es capaz de estimular la precipitación de la insulina, siendo ésta una reacción típica de las óxido-reductasas de puentes disulfuro (Holmgren, 1979). Todos estos datos condujeron a la conclusión de que DsbA era requerida en *E. coli* para la formación eficiente de puentes disulfuro en proteínas de exportación, siendo la primera proteína descrita con tal función en bacterias. Mediante otra estrategia, buscando mutantes de *E. coli* deficientes en la actividad fosfatasa alcalina, Kamitani *et al.* (1992) clonaron y caracterizaron el mismo gen anteriormente descrito, denominándolo *ppfA*. A partir de este momento se produce un intenso estudio de nuevos fenotipos asociados a mutaciones en *dsbA* de *E. coli*, localizándose genes homólogos en otras especies bacterianas e identificándose nuevos genes implicados en la ruta de formación de puentes disulfuro.

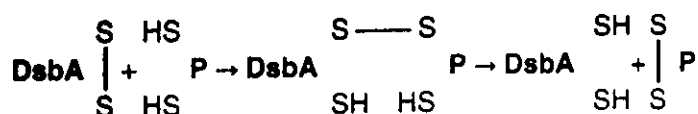
La inactivación de *dsbA* conduce a la alteración de diversas funciones celulares en *E. coli*. De esta forma se han descrito entre otras: 1) la ausencia de movilidad debido a alteraciones en el correcto ensamblaje de ciertos componentes de los flagelos, concretamente la proteína FlgI que para ser funcional requiere un puente disulfuro intramolecular (Dailey y Berg, 1993); 2) deficiencias en el ensamblaje de las fimbrias tipo P de *E. coli* patógenos de vías urinarias por alteración del plegamiento y funcionalidad de la chaperona PapD, fundamental para el transporte hasta membrana externa de diversos componentes integrantes de las fimbrias (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994); 3) sensibilidad al agente reductor DTT y a la bencilpenicilina (Missiakas *et al.*, 1993); y 4) incapacidad de adquirir la conformación activa (debida a la formación de puentes disulfuro) de las enterotoxinas termoestables de *E. coli* de tipo I (Yamanaka *et al.*, 1994) y de tipo II (Okamoto *et al.*, 1995). La transcripción de *dsbA* en *E. coli* se realiza desde dos promotores, uno de ellos situado en la región 5' de *dsbA* y el otro situado en la región 5' de un ORF situado inmediatamente antes de *dsbA*, contribuyendo ambos de igual manera (Belin y Boquet, 1994). La estructura cristalina de la forma oxidada (con puente disulfuro entre sus dos cisteínas) de DsbA de *E. coli* ha mostrado ser semejante en términos globales a la de la tiorredoxina (Martin *et al.*, 1993).

Se han descrito en otras especies bacterianas diversas proteínas homólogas a DsbA, tanto desde el punto de vista de la secuencia de aminoácidos (fundamentalmente conservados los constituyentes y próximos al centro activo anteriormente descrito), como en el aspecto funcional por su capacidad de complementar los fenotipos característicos de mutantes *dsbA* de *E. coli*. En todos los casos que se van a citar a continuación, la identificación de los genes codificantes de proteínas tipo DsbA se realizó mediante la complementación de fenotipos de mutantes defectivos en la formación de puentes disulfuro en proteínas de exportación. De esta manera se ha clonado de *Haemophilus influenzae* el gen codificante de la proteína Por (205 aa con un 45% de identidad respecto a DsbA) después de comprobarse que su mutación era la responsable de un fenotipo de deficiencia en el sistema inducible de captación de DNA en esta bacteria (Tomb, 1992). En el caso de *Vibrio cholerae*, la mutación en el denominado gen *tcpG* o *dsbA* (codificante de una proteína de 200 aa que presenta un 40% de identidad con DsbA de *E. coli*) dió lugar a mutantes defectivos en la funcionalidad del *pilus* TCP, disminución de la actividad proteasa y en la secreción de la subunidad A de la toxina colérica (Peek y Taylor, 1992). Así mismo, el ensamblaje en mutantes *dsbA* de *V. cholerae* de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (homóloga estructural a la subunidad B de la toxina colérica) se observó disminuida debido a la carencia del puente disulfuro intramolecular necesario para que se lleve a cabo el proceso (Yu *et al.*, 1992). En *Shigella flexneri* la funcionalidad de su proteína DsbA se ha mostrado fundamental para la secreción de las proteínas IpaB, C y D, esenciales en el proceso de invasión de células epiteliales por esta bacteria (Watarai *et al.*, 1995). Por otro lado, también se ha clonado el gen correspondiente a *dsbA* de *Erwinia chrysanthemi*, transformando con una genoteca de la misma un mutante *dsbA* de *E. coli* y seleccionando transformantes móviles (Shevchik *et al.*, 1994). Por último, se ha descrito un gen (*bdb*) de la bacteria Gram positiva *Bacillus brevis* capaz de complementar el fenotipo de inmovilidad de mutantes en *dsbA* de *E. coli* (Ishihara *et al.*, 1995).

Mediante mutagénesis dirigida, cambiando las cisteínas del centro activo por otros aminoácidos en DsbA de *E. coli* (Wunderlich *et al.*, 1995) y *V. cholerae* (Yu *et al.*, 1993), se ha demostrado que son esenciales en la actividad que presentan dichas proteínas. Desde el punto de vista bioquímico, DsbA se muestra como un potente agente oxidante, ideal para generar puentes disulfuro en proteínas (Figura 1.5).

Curiosamente, y de manera opuesta a lo que sucede habitualmente, en el caso de DsbA la presencia del puente disulfuro entre sus dos cisteínas es muy inestable, desestabilizando la conformación plegada de la proteína y siendo por tanto este puente muy reactivo (Wunderlich *et al.*, 1993; Zapun *et al.*, 1993).

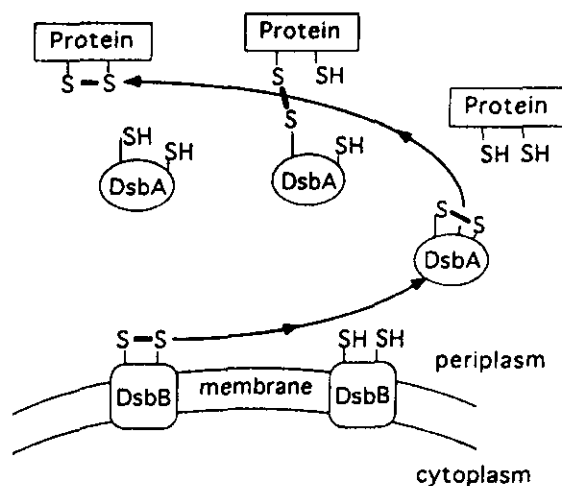
Como resultado de la búsqueda de nuevos genes que pudieran ir completando una teórica ruta de formación de puentes disulfuro en periplasma, se describió de manera prácticamente simultánea por parte de varios grupos de investigación el gen denominado *dsbB* de *E. coli*. Este



**Figura 1.5.-** Esquema propuesto para la reacción de transferencia de puente disulfuro entre DsbA y las proteínas sustrato (Bardwell, 1994).

gen se aisló empleando estrategias basadas en la obtención de mutantes que presentaran fenotipos semejantes a los descritos para mutantes en *dsbA*, (Dailey y Berg, 1993; Missiakas *et al.*, 1993; Bardwell *et al.*, 1993). La proteína identificada, DsbB, de un tamaño aproximado de 20 kDa, presenta el centro activo propio de óxido-reductasas de puentes disulfuro y se ha postulado su probable localización en la membrana citoplásmica. El doble mutante *dsbA/dsbB* presentó un defecto en la formación de puentes disulfuro indistinguible de los mutantes *dsbA*; por otro lado la adición de cistina (poseedora de puente disulfuro en su molécula) al medio de cultivo recuperaba el fenotipo debido a la mutación *dsbB*, pero de una manera muy poco eficiente el de mutantes en *dsbA*. Es interesante destacar que en cepas deficientes en DsbB, DsbA se encuentra mayoritariamente en forma reducida (sin puente disulfuro), cuando en cepas silvestres lo normal es encontrar una mezcla de formas reducidas y oxidadas. Todos estos datos parecen indicar que realmente el papel de DsbB *in vivo* es reoxidar continuamente a DsbA (Bardwell *et al.*, 1993) (Figura 1.6). Posteriormente, Jander *et al.* (1994) comprobaron que DsbB presenta cuatro dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo de la proteína situados en el citoplasma y con dos regiones periplásmicas. La proteína contiene seis cisteínas, y mediante mutagénesis, intercambiándolas por alanina, se han mostrado esenciales para la funcionalidad de la proteína cuatro de ellas, que concretamente son las que según el modelo propuesto se encuentran localizadas en las regiones periplásmicas.

Otro de los genes descritos relacionados con la formación de puentes disulfuro ha sido *dsbC* de *E. coli* y *Erwinia chrysanthemi*. En el primer caso fue identificado por Missiakas *et al.* (1994) mediante el análisis de mutantes sensibles a 10mM de DTT en el medio de cultivo (concentración tolerada por las cepas silvestres) y defectivos en la formación de puentes disulfuro en periplasma. La secuencia de *dsbC* coincidió con un ORF anteriormente descrito, pero de función desconocida (*xprA*). DsbC (23,3 kDa) presenta en su secuencia el centro activo común a las óxido-reductasas de puentes disulfuro, una localización periplásmica, y purificada mostró *in vitro* actividad óxido-reductasa. El fenotipo mutante se recupera con la adición de cistina al medio de cultivo. Los



**Figura 1.6.-** Ruta de formación de puentes disulfuro en proteínas periplásmicas mostrando la participación de DsbA y DsbB. Las flechas indican la dirección de transferencia de puentes disulfuro (Bardwell, 1994).

mutantes *dsbA*, *dsbB* o *dsbA/dsbB* pueden ser complementados con la sobreexpresión de *dsbC*; sin embargo, la mutación en *dsbC* puede ser complementada por *dsbA* pero no por *dsbB*. Dobles mutantes *dsbC/dsbA* y *dsbC/dsbB* muestran fenotipos más acusados que los correspondientes a los mutantes individuales. A partir de estos resultados se hipotetizó que DsbC y DsbA pueden constituir dos sistemas paralelos en el mantenimiento del estado oxidativo del espacio periplásmico de *E. coli*. En *E. chrysanthemi* el gen *dsbC* complementa mutantes *dsbA* a 30°C, pero no a 37°C y además los mutantes *dsbC* carecen de fenotipo apreciable (Shevchik *et al.*, 1994). DsbC de *E. coli* y *E. chrysanthemi* presentan una identidad de un 66%. Los estudios bioquímicos han mostrado que el puente disulfuro con actividad óxido-reductasa de DsbC de *E. coli* es muy reactivo, de forma similar al de DsbA, y se presenta como un homodímero. A diferencia de DsbA, muestra *in vitro* una marcada actividad isomerásica, la cual se postula que podría ser su función principal *in vivo* (Zapun *et al.*, 1995).

Por último, Missiakas *et al.* (1995) han descrito recientemente un nuevo componente de la familia de las proteínas Dsb, denominada DsbD (53 kDa), que parece presentar actividad de reductasa en el espacio periplásmico. Los doble mutantes *dsbD/dsbA* presentan fenotipos silvestres en cuanto a sensibilidad a la bencilpenicilina y DTT, así como en cuanto a movilidad. Esto se explicaría debido a que la ausencia en el periplasma de los principales agentes oxidante y reductor establecería un nuevo equilibrio entre los restantes componentes de la ruta Dsb. La secuencia de DsbD muestra ciertas regiones, fundamentalmente la próximas al centro activo, muy emparentadas con diversas disulfuro isomerazas de eucariotas. Por otro lado, se han detectado entre seis y ocho regiones transmembrana, indicando que la proteína estaría localizada en

membrana citoplásmica, con el centro activo característico Cys-X-X-Cys en el extremo carboxilo-terminal situado probablemente en zona periplásmica.

El mutante *dsbD* presenta un fenotipo parcialmente similar al de otros mutantes alterados en funciones Dsb; no obstante, resulta ser termosensible para el crecimiento a temperaturas superiores a 42°C sugiriendo el absoluto requerimiento de DsbD ante tales condiciones de estrés. Se ha observado que en mutantes *dsbD* las proteínas DsbA y DsbC se encuentran en un estado mayoritariamente oxidado comparadas con su situación en una cepa silvestre indicando la alteración del equilibrio reducción/oxidación en el periplasma después de la inactivación de *dsbD*.

Es importante resaltar el continuo estudio y publicación de nuevos datos relacionados con proteínas participantes en la ruta de formación de puentes disulfuro en periplasma; así, se espera la próxima publicación de la clonación de otro componente Dsb, concretamente *dsbE* (Missiakas *et al.*, 1995).

# OBJETIVOS

Este trabajo supone la caracterización detallada del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* y el comienzo del estudio de la región homóloga a este detectada en el cromosoma de *S. typhi* y *S. enteritidis*. Se ha elegido el serotipo Enteritidis por ser el de mayor incidencia en España, y debido a que se dispone de escasa información sobre su plásmido de virulencia, a excepción de la región *spv*.

Los objetivos planteados han sido los siguientes:

- 1.- Cartografiado del plásmido de virulencia.
- 2.- Elaboración de un mapa génico del plásmido de virulencia mediante secuenciación parcial, profundizando en la caracterización de alguna de las regiones menos estudiadas en los plásmidos pertenecientes a los diferentes serotipos, fundamentalmente de las próximas a la región de transferencia (*tra*).
- 3.- Detección, clonación y caracterización de regiones homólogas al plásmido de virulencia de *S. enteritidis* presentes en el cromosoma de *S. typhi*.
- 4.- Secuenciación y estudio comparativo de las secuencias de los dos ORFs, tanto el cromosómico de *S. typhi* como el plasmídico de *S. enteritidis*, cuyas secuencias deducidas de aminoácidos son homólogas a proteínas tipo DsbA.

Teniendo en cuenta el tamaño del plásmido (60 kb), el objetivo 1 y los casos concretos de localización de *rck* y *traT* del objetivo 2 se han realizado conjuntamente con D. Miguel Buisán Catevilla, que se ha ocupado además de la construcción de los clones marcados como "pFM".

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1.- Materiales.

### 2.1.1.- Medios de cultivo.

#### 2.1.1.1.- Medio LB (Luria Bertani).

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	10 g
Agua destilada	1 l

Se ajustó el pH a un valor de 7 con NaOH 0,1 N y se esterilizó el medio en autoclave durante 20 minutos a 1 atmosfera.

El medio sólido se preparó con 15 g/l de agar. En los casos en que se quiso detectar actividad  $\beta$ -galactosidasa, este medio se suplementó con el sustrato 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) hasta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml y con el inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml; ambos suministrados por la casa Boehringer Mannheim.

Cuando fue necesario se añadió ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml.

#### 2.1.1.2.- Medio MacConkey.

Composición:

Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Rojo neutro	0,05 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g

Se preparó a partir del correspondiente medio deshidratado de la casa ADSA-MICRO siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó en ciertos casos para el cultivo de las distintas cepas de *Salmonella*.

### 2.1.2.- Marcadores de pesos moleculares de DNA.

Se emplearon los marcadores de pesos moleculares de DNA II, III y VI suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim.

**-Marcador de pesos moleculares II** (DNA del fago lambda digerido con *HindIII*).

Tamaño de los fragmentos: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 pb.

**-Marcador de pesos moleculares VI** (DNA del plásmido pBR328 digerido con *BglI* y DNA del plásmido pBR328 digerido con *HinfI*).

Tamaño de los fragmentos: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 pb.

### 2.1.3.- Plásmidos.

Plásmido	Fenotipo	Referencia
YEp356	Amp <sup>R</sup>	Myers <i>et al.</i> , 1986
YEp357	"	"
YEp358	"	"
YEp356R	"	"
YEp357R	"	"
YEp358R	"	"
pBluescript <sup>®</sup>	"	Stratagene

Los plásmidos YEp356R, YEp357R y YEp358R se han utilizado para aislar promotores de bacterias. Tienen dos orígenes de replicación: el del plásmido ColE1 de *E. coli*, y el del plásmido 2  $\mu$ m de *Saccharomyces cerevisiae* (inútil en este trabajo), así como marcadores de selección para ambos microorganismos. Contienen además la región estructural de gen *lacZ* de *E. coli* excepto los 7 primeros codones que han sido sustituidos por *polylinkers* con un elevado número de puntos de corte únicos para endonucleasas de restricción. Utilizando los tres plásmidos se puede insertar una secuencia de DNA en las tres fases de lectura con respecto a *lacZ* y generar así tres proteínas de fusión de las que una tendrá actividad  $\beta$ -galactosidasa, siempre y cuando el inserto contenga un promotor, un sitio de unión a ribosomas y un triplete de iniciación. Los plásmidos YEp356, YEp357 y YEp358 poseen el *polylinker* en la orientación contraria (Figura 2.1).

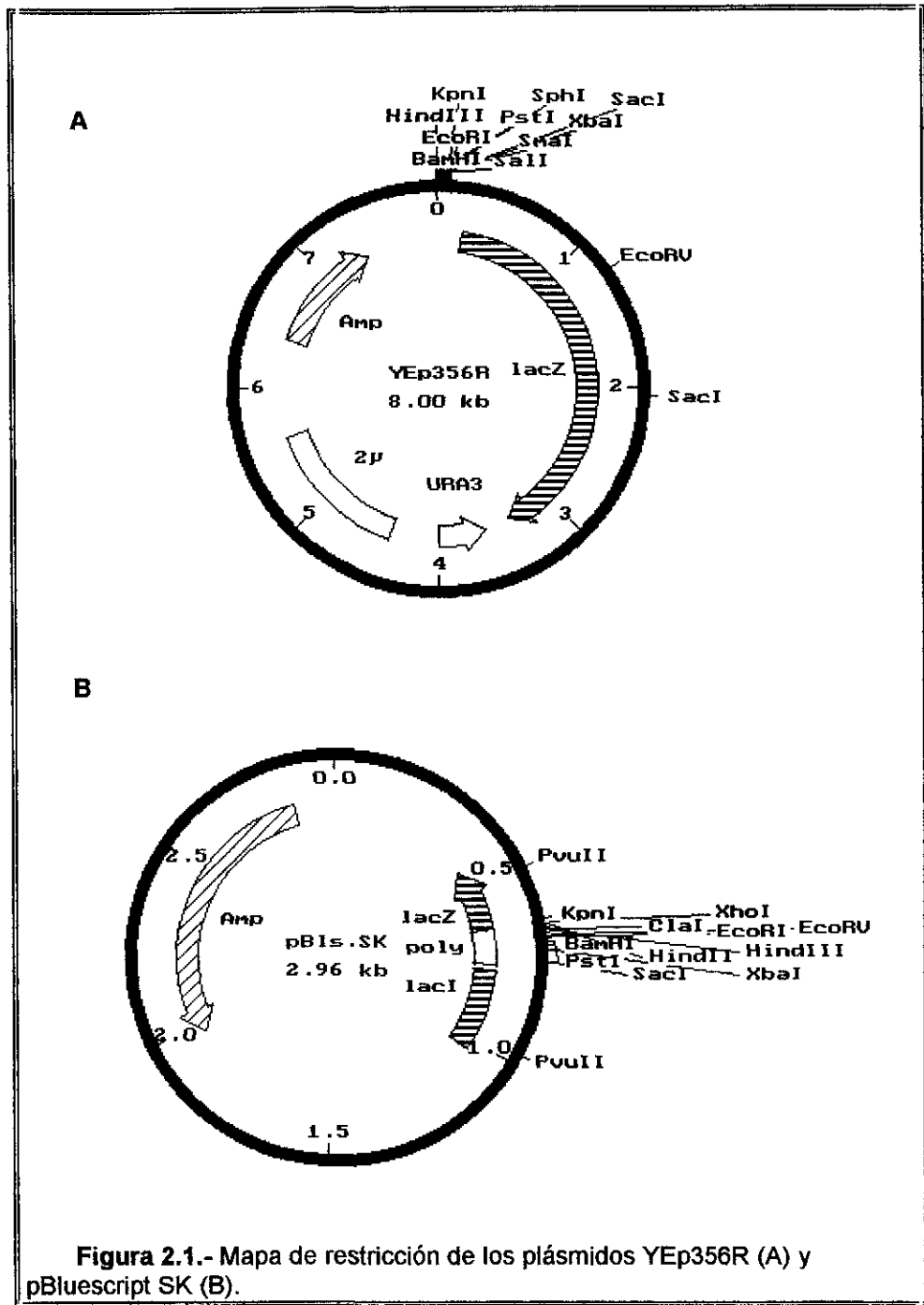


Figura 2.1.- Mapa de restricción de los plásmidos YEp356R (A) y pBluescript SK (B).

### 2.1.4.- Cepas.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> V517	Contiene 8 plásmidos de tamaños: 54,2 kb, 7,2 kb, 5,6 kb, 5,1 kb, 3,9 kb, 3 kb, 2,7 kb y 2,1 kb.	Macrina <i>et al.</i> , 1978.
<i>S. enteritidis</i> 82139	Silvestre, aislado clínico de una muestra de heces. Contiene un plásmido de 60 kb.	Instituto de Salud Carlos III.
<i>S. enteritidis</i> 366	Silvestre, aislado clínico. Contiene un plásmido de 5,6 kb.	Ibáñez y Rotger, 1993.
<i>S. typhi</i> 5866	Silvestre, aislado clínico de una muestra de sangre.	Instituto de Salud Carlos III.
<i>S.typhimurium</i> JR501	<i>hsdSA29 hsdSB121 hsdL6 trpC2 metA22 metE551 ilv452 leu3121 rpsL120 galE719 xyl-404.</i> Contiene el plásmido de virulencia 91 kb.	Ryu y Hartin, 1990.

### 2.1.5.- Nomenclatura.

- En este trabajo se ha utilizado la nomenclatura tradicional de *Salmonella*, nombrando los serotipos como si de especies se tratara. Así, *Salmonella choleraesuis* subespecie *choleraesuis* serotipo Enteritidis aparece como *Salmonella enteritidis*.

### 2.1.6.- Soporte informático.

- Bancos de genes y proteínas del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y bancos de secuencias internacionales interconectados. A través de la red Internet suministrada por la U.C.M. se emplearon los programas para búsqueda de secuencias homólogas depositadas en los bancos citados: FASTA, BLITZ y BLAST.

- PC/GENE Sequence Analysis, IntelliGenetics.

## 2.2. - Métodos.

Los métodos de manipulación y conservación de microorganismos y las técnicas de manipulación genética de microorganismos o de fragmentos de DNA, utilizados a lo largo del presente trabajo se encuentran descritos en manuales convencionales. Se ha adoptado el criterio de indicar únicamente las fuentes donde se pueden hallar estos métodos. Algunos se explican de forma detallada cuando se han realizado modificaciones o ajustado a las condiciones del ensayo.

### 2.2.1.- Preparación de DNA genómico de bacterias.

Se siguió el procedimiento descrito por Ausubel *et al.* (1993). Brevemente las bacterias de un cultivo en fase estacionaria se lisaron y las proteínas se eliminaron por tratamiento con proteinasa K. Los restos de la membrana, polisacáridos y restantes proteínas se eliminaron mediante precipitación selectiva con CTAB (N-cetil-N,N,N-trimetil-amonio bromuro), y el DNA del sobrenadante obtenido se precipitó con isopropanol.

### 2.2.2.- Extracción de DNA plasmídico de *Salmonella*.

Se utilizó el método de Kado y Liu (1981).

2.2.2.1.- Cultivar el microorganismo en 3 ml de medio LB a 37°C con agitación durante 12 horas.

2.2.2.2.- Recoger las células por centrifugación durante 2 minutos a 3600 rpm.

2.2.2.3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 0,1 ml de TE.

2.2.2.4.- Lisar las células por adición de 0,4 ml de la solución de lisis (lauril-sulfato sódico al 3% en Tris-HCl 50 mM, pH 12,6) mezclando por inversión suave del tubo. Incubar a 60°C durante 20 minutos.

2.2.2.5.- Añadir 1 ml de fenol/cloroformo (v/v) y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos.

2.2.2.6.- Recoger la fase acuosa y proceder igual que en el punto anterior, centrifugando en esta ocasión 2 minutos.

2.2.2.7.- Tratar la fase acuosa con 1/2 volúmen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm, recoger la fase superior y eliminar los restos de fenol añadiendo 2 volúmenes de éter. Centrifugar 1 minuto y eliminar la fase superior.

2.2.2.8.- Precipitar el DNA con 0,10 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol, previamente enfriado, durante 20 minutos a -20°C.

2.2.2.9.- Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm. Lavar el precipitado con etanol al 70% y secar al vacío.

2.2.2.10.- Resuspender en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0;EDTA 1 mM) o H<sub>2</sub>O.

### 2.2.3.- Extracción de DNA plasmídico de *Escherichia coli*.

Se utilizó el método descrito por Birboim y Doly (1979) con algunas modificaciones que se especifican a continuación:

2.2.3.1.- Cultivar la bacteria en 10 ml de LB, suplementado si es necesario con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C y con agitación.

2.2.3.2.- Recoger las células por centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos.

2.2.3.3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 200 µl de la solución de lisis I. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3.4.- Añadir 400 µl de solución de lisis II previamente enfriada, mezclar, por inversión suave del tubo, e incubar 5 minutos en hielo.

2.2.3.5.- Añadir 300 µl de solución de lisis III fría, mezclar, por inversión suave del tubo, y repetir la incubación anterior.

2.2.3.6.- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm y recoger el sobrenadante. Si quedan restos del precipitado centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Precipitar el DNA por adición de 500 µl de isopropanol, enfriando a -20°C, e incubando 10 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3.7.- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de TE. Añadir 200 µl de LiCl 5 M e incubar 5 minutos a -20°C.

2.2.3.8.- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm, recoger el sobrenadante y precipitar el DNA por adición de 2 volúmenes de etanol a -20°C y 0,1 volumen de acetato sódico 3M. Incubar a -20°C durante 20 minutos y centrifugar 10 minutos a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70% enfriado a -20°C. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y secar el DNA al vacío. Resuspender en 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) o H<sub>2</sub>O.

Normalmente 1 µl de este preparado contiene el DNA suficiente para visualizarlo en un gel.

La técnica da buen resultado para plásmidos multicopia que no excedan las 20 kb de tamaño.

#### - Solución de lisis I

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0

#### - Solución de lisis II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Debe prepararse antes de su uso a partir de NaOH 2 N y SDS al 10%.

**- Solución de lisis III**

Acetato potásico	29,4 g
Acético glacial	11,5 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 100 ml

**2.2.4.- Extracción rápida de DNA plasmídico de *E. coli*: método *boiling*.**

Este método, se empleó en los casos donde se requería la obtención de DNA de manera rápida y en pequeña escala. Se siguió el procedimiento descrito por Holmes y Quigley (1981), por ebullición de las células en presencia de lisozima.

**2.2.5.- Electroforesis en geles de agarosa.**

Se realizó según las técnicas descritas por Sambrook *et al.* (1989). La concentración usual de agarosa fue de un 0,7-0,8%, aunque se han empleado rangos variables entre 0,5% y 2% dependiendo del tamaño de las bandas de DNA objeto de análisis.

**2.2.6.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.**

Las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, empleándose para ello agarosa ultrapura, *Seakem GTG*, suministrada por la marca comercial FMC Bio Products.

Para la elución del DNA se siguieron las indicaciones de los fabricantes del *Sephaglas Band Kit* (Pharmacia) y *GeneClean II* (Bio 101, Inc.).

**2.2.7.- Determinación de tamaño, pureza y concentración de DNA.****2.2.7.1.- Determinación de tamaño.**

La determinación del tamaño molecular de DNA circular covalentemente cerrado se efectuó calibrando el gel de electroforesis con el patrón de plásmidos de tamaño conocido, presentes en la cepa *E. coli* V517.

Para la determinación del tamaño molecular de DNA lineal se emplearon los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción del fago lambda y/o del plásmido pBR328.

Se determinaron los factores de migración de los patrones empleados, obteniéndose posteriormente una recta de regresión. A partir de esta recta de regresión se calcularon las masas moleculares desconocidas en base a su factor de migración en el gel.

### **2.2.7.2.- Determinación de la pureza.**

El índice de pureza se estimó midiendo la absorbancia (A) a 280 nm y a 260 nm y determinando la relación  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ , que para el DNA puro es de 1,8-2,0.

### **2.2.7.3.- Determinación de la concentración.**

La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm de longitud de onda. Como valor de referencia, se consideró que 1 unidad de absorbancia corresponde a 30 µg/ml para oligonucleótidos y 50 µg/ml para DNA de doble cadena.

## **2.2.8.- Tratamientos enzimáticos del DNA.**

### **2.2.8.1.- Digestión con endonucleasas de restricción.**

La digestión del DNA con los distintos enzimas de restricción se llevó a cabo según se indica en Sambrook *et al.* (1989), utilizando el material proporcionado por Boehringer Mannheim.

### **2.2.8.2.- Desfosfatización del extremo 5' del DNA.**

Para evitar en las ligaciones la recircularización del vector cuando este había sido cortado con una sola enzima de restricción, se procedió a la desfosfatización del extremo 5' del DNA lineal. Se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) según el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989) con material suministrado por Boehringer Mannheim.

### **2.2.8.3.- Ligación de fragmentos de DNA.**

De nuevo se siguieron las recomendaciones de Sambrook *et al.* (1989); utilizando la DNA ligasa del fago T4 con su tampón correspondiente, procedentes ambos de la casa comercial Boehringer Mannheim. Las ligaciones se realizaron durante al menos 12 horas a 13°C en el caso en que los extremos a unir fueran cohesivos y en el caso de extremos romos a 22°C durante el mismo periodo de tiempo.

### **2.2.8.4.- Tratamiento con nucleasa *Bal* 31.**

*Bal* 31 (Boehringer Mannheim) tiene principalmente una actividad exonucleásica en 3', eliminando nucleótidos desde ambos extremos 3' de las dos cadenas de fragmentos lineales de DNA. Como también es una endonucleasa, el DNA de cadena sencilla generado por la actividad 3'-exonucleásica es degradado por la actividad endonucleásica. La actividad de *Bal* 31 es

totalmente dependiente de la presencia de calcio y por tanto puede ser detenida mediante la adición de agentes quelantes como el EDTA. Puesto que la degradación se produce de forma relativamente uniforme desde los extremos del DNA, la digestión con *Bal* 31 puede ser utilizada para la realización de mapas de restricción, partiendo de fragmentos lineales de DNA. El tratamiento del DNA con *Bal* 31 se ha realizado según indican Sambrook *et al.* (1989).

#### **2.2.8.5.- Obtención de deleciones seriadas.**

Se utilizaron en ciertos procesos de secuenciación con el fin de obtener plásmidos de tamaños correlativos que pudieran ser secuenciados utilizando siempre los mismos cebadores: los oligonucleótidos comerciales *reversal* y *universal primers*. Para llevar a cabo el proceso se siguieron básicamente las indicaciones del fabricante del *Double-stranded Nested Deletion Kit* (Pharmacia). De forma resumida, el plásmido en estudio, en forma lineal tras su digestión con dos endonucleasas de restricción (una que proporcione un extremo sensible a la acción de la nucleasa Exo III y otro resistente), es tratado con las nucleasas Exo III (que actúa sobre DNA de doble cadena eliminando de forma progresiva nucleótidos en dirección 3'-5' en una de las cadenas del DNA) a distintos tiempos y S1 (que elimina la cadena sencilla que genera la primera, para producir extremos romos), se ligó la mezcla y se transformó el DNA así tratado en *E. coli* DH5 $\alpha$ , seleccionando clones cuyos plásmidos tuvieran tamaños correlativos mediante análisis de restricción y que se diferenciaban en 200-250 pb entre sí.

#### **2.2.9.- Transformación de *E. coli*.**

La transformación de plásmidos en *E. coli* DH5 $\alpha$  se llevó a cabo, según el caso, empleando dos métodos, el del CaCl<sub>2</sub> con modificaciones que se describe a continuación (Mandel y Higa 1970) y el descrito por Hanahan (1985).

##### **2.2.9.1.- Preparación de células competentes por el método del CaCl<sub>2</sub>.**

2.2.9.1.1.- Preparar un preinóculo sembrando una colonia en 2 ml de LB e incubar a 37°C con agitación durante toda la noche.

2.2.9.1.2.- Inocular 50 ml de LB, en matraz de 250 ml (dilución 1:25). Crecer a 37°C con agitación hasta alcanzar una D<sub>600 nm</sub> entre 0,45 y 0,55.

2.2.9.1.3.- Enfriar en hielo durante 15 minutos. Centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm y 4°C. Eliminar el sobrenadante. Trabajar a partir de este momento a temperaturas de 0-4°C.

2.2.9.1.4.- Resuspender las células en una gota del sobrenadante y añadir 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 30 mM enfriado en hielo. Incubar 15-20 minutos en hielo.

2.2.9.1.5.- Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Eliminar el sobrenadante.

2.2.9.1.6.- Resuspender el precipitado en 4 ml de  $\text{CaCl}_2$  100 mM y glicerol al 15%, previamente enfriado. Emplear una pipeta para resuspender las células. La incubación en hielo por unos minutos aumenta la competencia.

2.2.9.1.7.- Repartir la suspensión de células en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Conservar a  $-70^\circ\text{C}$ .

### 2.2.9.2.- Transformación.

2.2.9.2.1.- Descongelar las células competentes incubándolas en hielo durante 10-15 minutos.

2.2.9.2.2.- Añadir 25  $\mu\text{l}$  de DNA (como máximo), 50  $\mu\text{l}$  de tampón de transformación, previamente enfriado, e incubar 25 minutos en hielo.

2.2.9.2.3.- Incubar 2 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 10 minutos a temperatura ambiente.

2.2.9.2.4.- Añadir 1 ml de LB e incubar durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con agitación.

2.2.9.2.5.- Sembrar en placas de LB agar, con el antibiótico correspondiente, a razón de 100  $\mu\text{l}$  de mezcla de transformación por placa como máximo.

#### - Tampón de transformación

Tris-HCl	10 mM, pH 7,5
$\text{CaCl}_2$	10 mM
$\text{MgCl}_2$	10 mM

### 2.2.9.3.- Cálculo de la frecuencia de transformación.

2.2.9.3.1.- Valorar la concentración del DNA. Preparar una dilución del DNA en TE. Medir  $A_{260}$  frente a TE. Calcular la concentración sabiendo que 1U de Absorbancia equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

2.2.9.3.2.- Transformar una cantidad conocida del DNA valorado.

2.2.9.3.3.- Contar número de transformantes obtenidos y calcular la frecuencia de transformación = nº de transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA.

## 2.2.10.- Hibridación DNA-DNA.

Se empleó un procedimiento no radiactivo. Para ello se realizó el marcaje de la sonda con digoxigenina mediante el *DNA Labeling and Detection Kit Nonradiactive* (Boehringer Mannheim).

### 2.2.10.1. - Fundamento de la técnica.

Los fragmentos de DNA empleados como sondas son marcados no radiactivamente por el procedimiento de cebado al azar (*random priming*). Se utiliza una mezcla de hexanucleótidos que hibridan al azar con la sonda (desnaturalizada previamente), y actúan como cebadores para la DNA polimerasa. En la reacción de polimerización se añade a la mezcla de desoxinucleótidos,

dATP, dCTP, dGTP y dTTP, un quinto marcado con digoxigenina, DIG-dUTP. Los tres primeros van en idéntica proporción, mientras que el dTTP y el DIG-dUTP suponen 2/3 y 1/3 respectivamente de las cantidades de los anteriores.

Después de la hibridación de la sonda marcada al DNA molde, los híbridos son detectados mediante inmunoensayo utilizando una enzima, la fosfatasa alcalina, ligada a un anticuerpo antidigoxigenina, catalizando diversas reacciones de detección según los sustratos empleados.

### **2.2.10.2.- Transferencia del DNA a una membrana de nylon.**

Se realizó previamente electroforesis en gel de agarosa a bajo voltaje (50-60 V). Posteriormente se procedió a la desnaturalización del DNA como se indica a continuación.

2.2.10.2.1.- Tratar dos veces con HCl 0,25 N durante 10 minutos y con agitación suave. En éste y los siguientes tratamientos el gel debe estar totalmente cubierto por las soluciones.

2.2.10.2.2.- Lavar con H<sub>2</sub>O destilada 5 minutos.

2.2.10.2.3.- Tratar con una solución NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M, durante 15 minutos y con agitación suave. Repetir dos veces.

2.2.10.2.4.- Aplicar tres lavados de 10 minutos cada uno de AcNa 3 M, pH 5,5

El DNA fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) empleando el proceso uni o bidireccional, según el caso, según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### **2.2.10.3.- Marcaje de los fragmentos de DNA.**

2.2.10.3.1.- Los fragmentos de DNA empleados como sondas se purificaron por extracción con fenol y precipitación con etanol.

2.2.10.3.2.- Se desnaturalizó el DNA sonda por calentamiento a 95°C durante 10 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo.

2.2.10.3.3.- Se adicionó a un tubo eppendorf puesto en hielo:

-Aproximadamente 1 µg de DNA sonda (5 µl) desnaturalizado.

-2 µl de mezcla de hexanucleótidos, 10x concentrada proporcionada por el kit (*random primers*).

-2 µl de una mezcla de dNTP's de marcaje 10x concentrada con dATP 1mM, dCTP 1mM, dGTP 1mM, dTTP 0,65mM, Dig-dUTP 0,35 mM, pH=6,5.

-H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 19 µl.

-1 µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

2.2.10.3.4.- Se incubó durante 16 horas a 37°C.

2.2.10.3.5.- Se detuvo la reacción por adición de 2 µl de EDTA 0,2 M, pH=8.

2.2.10.3.6.- Se purificó el DNA marcado con dígoxigenina por precipitación en un tubo eppendorf, con 2,5 µl de LiCl 4M y 75 µl de etanol 98% frío (-20°C) y se precipitó a -70°C.

2.2.10.3.7.- Se centrifugó a 13000 rpm. Se lavó con etanol 70% frío, se secó y se resuspendió en 50 µl de Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH=8.

#### **2.2.10.4.- Prehibridación.**

##### **- Solución de prehibridación:**

- 25 ml de 20xSSC (NaCl 3M, citrato sódico 0,3M).
- 1,2 ml de 10xSDS.
- 5 g de reactivo bloqueante proporcionado por el Kit.
- Según la temperatura de prehibridación e hibridación utilizadas se adicionaron o no 50 ml de formamida.
- 5 mg de DNA de esperma de salmón (Boehringer Mannheim) desnaturalizado 10 minutos a 95°C
- H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen de 100 ml.

La disolución del agente bloqueante requiere una calefacción suave.

2.2.10.4.1.- Se utilizaron 30 ml de la solución de prehibridación por cada 100 cm<sup>2</sup> de la membrana que contenía el DNA transferido.

2.2.10.4.2.- Se incubó la membrana a 68°C (en ausencia de formamida) o a 42°C (en caso de uso de formamida) durante al menos 1 hora.

#### **2.2.10.5.- Hibridación.**

2.2.10.5.1.- Se eliminó la solución de prehibridación.

2.2.10.5.2.- Se preparó solución nueva (con la misma composición que la solución de prehibridación anterior pero sin el DNA de esperma de salmón) y se añadió la sonda marcada y desnaturalizada (100°C durante 10 minutos).

2.2.10.5.3.- Se pusieron 15 ml de solución por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana.

2.2.10.5.4.- Se incubó durante 18 horas a 68°C o a 42°C, si previamente se había utilizado formamida.

#### **2.2.10.6.- Fase de lavado.**

2.2.10.6.1.- Se lavaron los filtros a temperatura ambiente con al menos 50 ml de 2xSSC, 0,1% de SDS durante 5 minutos con agitación. Se repitió el proceso dos veces.

2.2.10.6.2.- Volver a lavar los filtros a 68°C con al menos 50 ml de 0,1xSSC, 0,1% SDS durante 15 minutos con agitación en dos ocasiones.

Las condiciones descritas hasta el momento fueron las habitualmente empleadas correspondiendo a condiciones de máximo rigor.

#### **2.2.10.7.- Detección inmunológica.**

Se emplearon tanto la detección colorimétrica como la quimioluminiscente dependiendo de las circunstancias, llevándose a cabo siguiendo las instrucciones suministradas con el Sistema de Marcaje y Detección No Radioactivo (Boehringer Mannheim).

#### **2.2.11.- Hibridación a partir de colonias (*Colony blot*)**

Esta técnica se emplea para el análisis rápido de genotecas como sistema de búsqueda de secuencias de DNA homólogas a la sonda empleada. El DNA al cual se enfrenta la sonda procede de la lisis de las colonias sobre la propia membrana de nylon. En nuestro caso se empleó la técnica no radiactiva mediante la utilización del *DNA Labeling and Detection Kit Nonradiactive* (Boehringer Mannheim).

2.2.11.1.- Hacer réplica de las colonias objeto de estudio sobre placas de LB suplementado con el correspondiente antibiótico.

2.2.11.2.- Después de que las colonias alcanzan un tamaño aproximado de 2 mm se llevan las placas a 4°C durante 1 hora.

2.2.11.3.- Situar sobre las placas discos de idéntico tamaño de membrana de nylon positivamente cargada (Boehringer Mannheim) durante 5 minutos.

2.2.11.4.- Separar las membranas e incubarlas, con la cara donde están depositadas las colonias hacia arriba, sobre papel Whatman 3 MM saturado con una solución desnaturalizante 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl durante 15 minutos.

2.2.11.5.- Incubar las membranas durante 15 minutos sobre papel Whatman 3 MM con la solución neutralizante 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 1,5 M NaCl.

2.2.11.6.- A partir de este punto se sigue el proceso descrito en las instrucciones suministradas con el Sistema de Marcaje y Detección No Radioactivo (Boehringer Mannheim), siendo básicamente similares a las descritas en el punto anterior. En nuestro caso se emplearon condiciones de hibridación de máximo rigor (68°C), el marcaje de la sonda se realizó de manera idéntica a la anteriormente descrita y la detección inmunológica se realizó por el método quimioluminiscente.

#### **2.2.12.- Secuenciación automática del DNA.**

Para la extracción del DNA se utilizó el kit *Qiagen* suministrado por Pharmacia, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La secuenciación automática se realizó en el secuenciador *A.L.F. DNA sequencer* de la casa comercial Pharmacia LKB.

### 2.2.13.- Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R.

Para la amplificación del DNA se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un termociclador Perkin Elmer Cetus modelo DNA Thermal Cycler.

Mezcla de reacción	Volumen	Concentración final
H <sub>2</sub> O destilada estéril	csp 100 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 $\mu$ l	2 mM
Tampón II PCRx10	10 $\mu$ l	1X
dGTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dATP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dTTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dCTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
Oligonucleótido 1	*	100 picomoles
Oligonucleótido 2	*	100 picomoles
DNA molde	⊗	<1 $\mu$ g/ 100 $\mu$ l

\* Según concentración del oligonucleótido.

⊗ Según concentración del DNA molde

Los dNTP's fueron suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim.

2.2.13.1- Para evitar la evaporación se adicionó a la mezcla de reacción 50  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma Chemical Co.).

2.2.13.2- Se introdujeron los eppendorf con la mezcla de reacción en los pocillos del termociclador, agregando previamente a dichos pocillos unas gotas del mismo aceite mineral para facilitar la transferencia del calor.

2.2.13.3- Se procedió a la desnaturalización del DNA molde por calentamiento a 97°C durante 10 minutos.

2.2.13.4- Adición de 0,5  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa (5 U /  $\mu$ l) (Perkin Elmer).

2.2.13.5- Ciclos de temperatura:

2.2.13.5.1.- Fase de desnaturalización :

Temperatura : 94°C

Tiempo : 30 segundos

2.2.13.5.2.- Fase de alineamiento :

Temperatura : 50°C (Depende de la temperatura de desnaturalización de los oligos)

Tiempo : 60 segundos

2.2.13.5.3.- Fase de síntesis :

Temperatura : 72°C

Tiempo : 60 segundos (Depende de la longitud del fragmento a sintetizar)

Estas tres fases, que constituyen un ciclo, se repitieron 30 veces.

2.2.13.6.- Ciclo final

Se realizó un último ciclo con una fase de desnaturalización y de alineamiento idéntica a la del apartado anterior pero con una fase de síntesis a 72°C pero que duró 10 minutos con el fin de rellenar zonas no sintetizadas en los anteriores ciclos.

2.2.13.7.- Por último se cargaron 5  $\mu$ l de la reacción en un gel de agarosa para verificar que se había producido la amplificación.

## **3.- RESULTADOS**

### 3.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*.

#### 3.1.1.- Análisis y detección de plásmidos.

Para la realización de esta parte del trabajo se escogió al azar una cepa de *S. enteritidis*, de entre las suministradas por el "Instituto de Salud Carlos III", con las condiciones de que albergase un plásmido de virulencia de tamaño representativo (60 kb) y hubiera sido aislada de muestras de origen humano durante un brote de gastroenteritis.

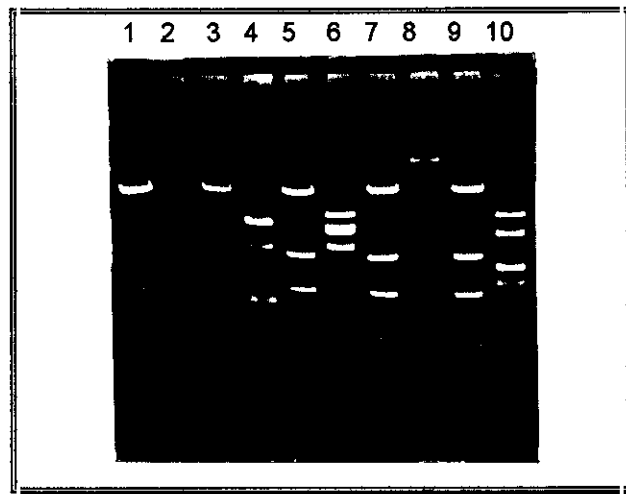
La cepa escogida, *S. enteritidis* 82139, fue aislada en 1986 de una muestra de heces. El plásmido de 60 kb de esta cepa se pudo detectar tanto por el método de Kado y Liu (1981) como por el de Birboim y Doly (1979) y se denominó pFM82139.

#### 3.1.2.- Clonación del plásmido pFM82139.

Se comenzó por realizar un análisis de restricción del plásmido con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I, *Xho*I y con las combinaciones *Sal*I/*Xho*I y *Xba*I/*Xho*I. El objetivo fue determinar con cuál de estas enzimas se podía obtener una serie de fragmentos que cumplieran dos requisitos: tener la longitud suficiente como para poder ser introducidos en un vector de clonación de las características de pBluescript SK y sumar en conjunto un tamaño lo más aproximado posible al estimado previamente para pFM82139 (Figura 3.1).

A la vista de los resultados del análisis electroforético de las muestras, ninguna de las enzimas satisfacía por completo las dos premisas, si bien *Hind*III era la que más se ajustaba a las mismas. Los seis fragmentos *Hind*III de aproximadamente 16, 12,4, 10,3, 3,7, 2,7 y 2 kb que *de visu* se detectaron en el gel de agarosa al 0,7% totalizaban un tamaño en torno a las 47 kb. Esto significaba que faltaban alrededor de 12-13 kb para completar las 60 kb de las que constaba pFM82139.

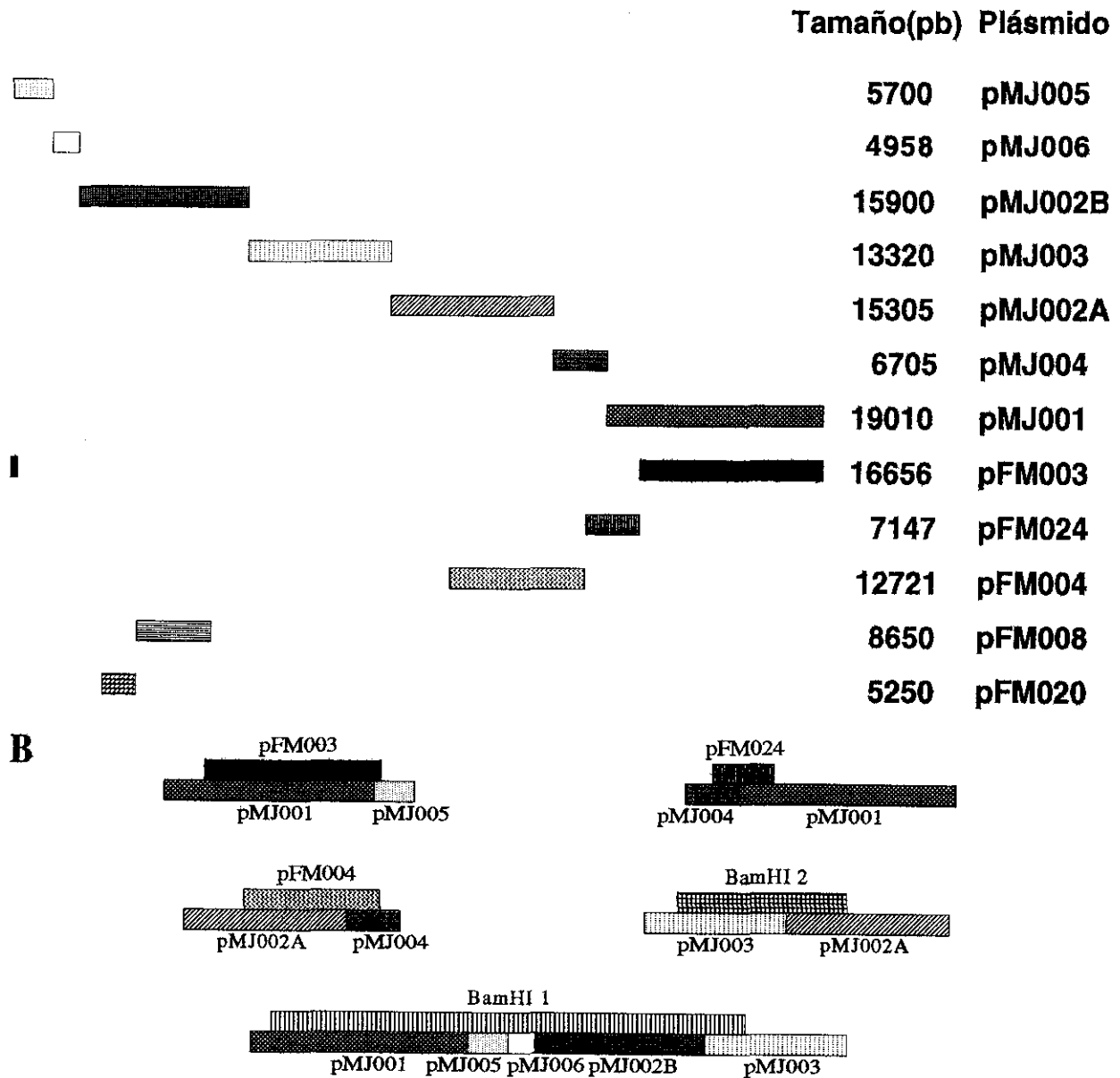
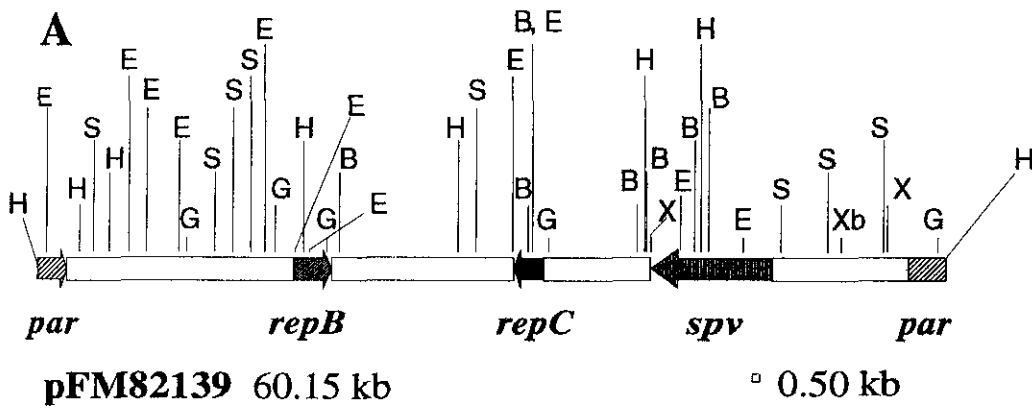
Se barajaron dos hipótesis que podían explicar este hecho. Una era la posible existencia de múltiples y próximos puntos de corte *Hind*III que originaran, tras la digestión del plásmido con dicha enzima, fragmentos de DNA lo suficientemente pequeños como para no poder ser detectados en geles de agarosa y que constituyeran las 12-13 kb que faltaban para completar las 60 kb. La otra, que fue la que pareció más verosímil, planteaba la existencia de dos o más fragmentos *Hind*III de igual tamaño y que por tanto no pudieran ser distinguidos como bandas distintas en geles de agarosa de los porcentajes habituales. Preparando geles de un menor porcentaje de agarosa (0,5%) y aplicando menores voltajes se consiguió el desdoblamiento de la segunda banda *Hind*III, que anteriormente se había considerado como una banda sencilla de 12,4 kb, en dos bandas de un tamaño correspondiente a 12,4 y 12,9 kb con lo cual la suma de los tamaños de todos los fragmentos *Hind*III de pFM82139 ya estaba alrededor de las 60 kb.



**Figura 3.1.-** Análisis electroforético en gel de agarosa del 0,7% de la digestión de pFM82139 con *XhoI* (2), *EcoRI* (4), *HindIII* (6), *XbaI* (8) y *Sall-XhoI* (10). En los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales).

Una vez comprobado que estos siete fragmentos representaban la totalidad del plásmido objeto de estudio y que poseían un tamaño adecuado para su clonación, se procedió a su clonación en pBluescript SK. Para ello se digirió pFM82139 con *HindIII*, se eluyó cada una de las siete bandas que aparecieron en el gel de electroforesis y se ligaron a pBluescript SK, previamente incubado con *HindIII*, desfosfatizado y eluído. Los productos de la ligación se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  y los transformantes se seleccionaron en placas de LB-ampicilina. Las construcciones resultantes correspondientes a cada uno de los fragmentos *HindIII*, en orden decreciente de tamaño, fueron denominadas: pMJ001, pMJ002B, pMJ002A, pMJ003, pMJ004, pMJ005 y pMJ006 (Figura 3.2).

Aunque ya se disponía de una genoteca aparentemente completa del plásmido de *S. enteritidis*, pareció interesante la clonación de algunos de los fragmentos de la digestión de dicho plásmido con *EcoRI*, puesto que de esta forma se dispondría de ellos con una mayor facilidad en posteriores estudios, habida cuenta de las dificultades de extracción de pFM82139. De los fragmentos *EcoRI* que se visualizaron en el gel, cuya suma de tamaños no equivalía al tamaño del plásmido entero, quizá por la existencia de bandas dobles, como en el caso de *HindIII*, o de fragmentos muy pequeños, únicamente se clonaron los correspondientes a las cinco bandas mayores. El vector y el procedimiento de clonación utilizados fueron los ya citados anteriormente. Estas nuevas construcciones fueron denominadas (entre paréntesis se especifica el tamaño de los insertos *EcoRI*): pFM003 (13 kb), pFM004 (10 kb), pFM008 (5,7 kb), pFM024 (4,2 kb) y pFM020 (2,3 kb).



**Figura 3.2.-** A. Mapa de restricción del plásmido pFM82139 y sus fragmentos clonados en pBluescript SK. Puntos de restricción: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bgl*I; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X, *Xho*I y Xb, *Xba*I. B. Esquema de los solapamientos realizados para el cartografiado de pFM82139.

### 3.1.3.- Verificación del origen de las construcciones pMJ y pFM.

Para comprobar que tanto los fragmentos *HindIII* como *EcoRI* clonados en pBluescript SK tenían un origen plasmídico y no cromosómico o de otra índole, se llevó a cabo un experimento de hibridación no radiactiva mediante la técnica de Southern, utilizando como sonda los distintos fragmentos *HindIII* y *EcoRI* obtenidos de cada uno de los clones. Dichas sondas fueron marcadas con digoxigenina y enfrentadas a pFM82139 digerido con las enzimas empleadas en la clonación, así como a los propios clones cortados con las mismas enzimas como control positivo y al DNA del fago lambda cortado con *HindIII* como control negativo. En todos los casos se produjo la hibridación de cada uno de los fragmentos *HindIII* y *EcoRI* obtenidos de las diferentes construcciones, consigo mismo y con la banda de pFM82139 de la que provenían, verificándose de esta manera su origen plasmídico. La técnica de revelado empleada en esta primera parte de la experimentación, salvo cuando se indique lo contrario ha sido mediante el método colorimétrico.

### 3.1.4.- Cartografiado de los clones pMJ y pFM.

Paralelamente se llevó a cabo el cartografiado de los siete fragmentos *HindIII* de pFM82139 y de los insertos *EcoRI* de los cinco clones pFM, con el fin de que los datos combinados permitieran la ordenación y orientación de los distintos fragmentos *HindIII*.

Para ello se digirió cada uno de los clones pMJ y pFM con una serie de enzimas que no cortaran el vector pBluescript SK o que lo hicieran en un único punto, y que tampoco fragmentaran de forma excesiva los insertos *HindIII* y *EcoRI*, con el fin de facilitar su localización en cada uno de los mismos y no complicar el estudio. Se tuvieron también en cuenta las enzimas empleadas por otros autores en el cartografiado de los plásmidos de virulencia de los distintos serotipos de *Salmonella*, ya que esto podía ser de gran utilidad en la realización de estudios comparativos de los perfiles de restricción de los mismos.

Las enzimas empleadas fueron: *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *SaI*, *XbaI* y *XhoI*, independientemente y en parejas, con el fin de situar de forma precisa sus puntos de corte en cada uno de los fragmentos. En los casos en que esto no fue posible se recurrió a la combinación de las anteriores enzimas con otras de similares características en cuanto a puntos de corte en el vector de clonación y en los insertos, tales como *SmaI*, *KpnI*, *PstI*, *ClaI*, *BglI*, *EcoRV*, *SacI*, *ScaI* y *ApaI* (Figura 3.2).

Como el cartografiado del clon pMJ002B fue más complejo, y requirió la utilización de procedimientos adicionales, se describirá en otro apartado.

### 3.1.4.1.- Cartografiado de la construcción pMJ002B.

El estudio del clon pMJ002B fue más complejo, puesto que al someterlo a digestión con *EcoRI* aparecieron cinco bandas de 5,7, 3,4, 2,3, 2,1, 1,3, y 1,2 kb, lo que indicaba que dentro del fragmento *HindIII* que contenía ese clon existían cinco puntos de corte para *EcoRI*. Las enzimas utilizadas en el cartografiado del resto de los fragmentos *HindIII* no cortaban, a excepción de *Sall*, pero esta enzima no fue de gran ayuda puesto que además de cortar en tres puntos el inserto *HindIII* de 12,9 kb, lo hacía únicamente dentro del mismo fragmento *EcoRI* de 5,7 kb. Las demás enzimas tampoco fueron útiles en un primer momento, por lo que para empezar a situar alguno de los fragmentos *EcoRI* hubo de recurrir a otros procedimientos que a continuación se detallan.

#### 3.1.4.1.1.- Digestión con *Bal31*.

La digestión de DNA lineal de doble cadena con esta nucleasa produce fragmentos de menor tamaño debido a la degradación de ambas cadenas en los dos extremos.

En primer lugar, se linearizó el clon pMJ002B con una enzima que tuviera un punto único de corte en un lugar conocido, concretamente en el *polylinker* del vector de clonación, para que *Bal31* pudiera actuar. Se eligió *BamHI*. Tras linearizar el clon, se digirió con *Bal31* y después se sometió a restricción con *EcoRI* para ver cuáles eran las bandas que disminuían de tamaño con respecto al patrón obtenido al cortar pMJ002B con dicha enzima. Se observó que la única banda que disminuía de tamaño era la de 1,3 kb lo cual indicaba que estaba en un extremo del fragmento *HindIII* de pMJ002B y que era contigua a la banda de 3,4 kb que contenía al vector de clonación y por tanto al punto de corte de *BamHI*.

La realización de un experimento de hibridación utilizando como sonda el fragmento *EcoRI* de 1,3 kb frente a una restricción con *EcoRI* del plásmido pFM82139, sirvió para confirmar este resultado. En dicha hibridación se observó como la sonda de 1,3 kb hibridaba con un fragmento *EcoRI* de mayor tamaño, lo cual significaba que no constituía un fragmento *EcoRI* por sí sola, sino que formaba parte de uno mayor, por lo que debía localizarse en un extremo de la banda *HindIII* de pMJ002B. Por otro lado, la banda de 1,2 kb hibridó con una banda *EcoRI* de pFM82139 de su mismo tamaño, lo que indicaba que se trataba de una banda de localización interna dentro del fragmento *HindIII* de pMJ002B.

#### 3.1.4.1.2.- Restricciones parciales.

La incubación del DNA con una endonucleasa de restricción durante períodos de tiempo breves, pero progresivamente mayores, permite obtener una serie de patrones de restricción parcial cuyo estudio permite predecir el orden en el que están situados los fragmentos a que dicha

endonucleasa de restricción da lugar. El mismo efecto se puede obtener empleando diluciones sucesivas de la enzima con un mismo periodo de incubación.

Para situar los puntos de corte de *EcoRI* del fragmento *HindIII* de pMJ002B se recurrió a incubar este clon con dicha endonucleasa durante distintos tiempos, 10, 20 y 30 minutos, y al analizarlas electroforéticamente se observó la existencia de una banda de aproximadamente 8 kb, cuya intensidad disminuía conforme aumentaba el tiempo de incubación. Esto era señal inequívoca de que se trataba de un fragmento producto de una restricción parcial, y que correspondía a la suma de las bandas de 5,7 kb y de 2,3 kb, de lo cual se podía deducir que eran contiguas. Aparecía también una banda de un tamaño cercano a las 5 kb, atribuible a la suma de la de 3,4 kb y de la de 1,3 kb, dato que corroboraba el obtenido en el experimento anterior realizado con *Bal31*. Por último, se observaba la presencia de una banda de 2,5 kb que podía corresponder a la suma de las bandas de 1,3 kb y 1,2 kb, lo cual sirvió para deducir cuál era la banda *EcoRI* que iba a continuación de la de 1,3 kb.

#### **3.1.4.1.3.- Análisis de restricción.**

Para terminar de situar todos los fragmentos *EcoRI* de pMJ002B y para confirmar la ordenación de los ya situados por los anteriores procedimientos, se recurrió al estudio detallado de su patrón de restricción. En este análisis fue de gran utilidad la enzima de restricción *BglII*. Esta tenía dos puntos de corte, perfectamente situados en el mapa de pMJ002B, que daban lugar a un fragmento de 10 kb y a otro de 5,9 kb. Dichos fragmentos se eluyeron y se digirieron por separado con *EcoRI*.

Se vió que el fragmento *BglII* de 5,9 kb daba lugar a una banda de 600 pb y a otra de 5,3 kb. Esto indicaba que la banda *EcoRI* de 5,7 kb debía estar incluida casi en su totalidad en este fragmento *BglII*. Por otro lado, la digestión de la banda *BglII* de 10 kb señaló que dentro de ella estaban incluidas por completo las bandas *EcoRI* de 3,4 kb, 1,3 kb, 1,2 kb y 2,3 kb, lo que hacía a esta última contigua a la de 1,2 kb. A la vista de estos resultados, la única banda *EcoRI* que quedaba por situar, la de 2,1 kb, sólo podía estar colocada entre la de 3,4 kb y la de 5,7 kb.

De esta forma la secuencia de fragmentos *EcoRI* de pMJ002B quedó totalmente resuelta.

La disposición de los tres puntos de corte *SalI* fue mucho más sencilla gracias a la existencia de un punto *BglI* situado entre las dianas de *SalI*, que sirvió como referencia para la localización de los mismos.

#### **3.1.5.- Localización de los fragmentos *HindIII* en pFM82139.**

El siguiente objetivo fue el ordenamiento de los distintos fragmentos *HindIII* ya cartografiados de la misma forma en que se hallaban en pFM82139. Para ello se recurrió a dos procedimientos que se utilizaron de forma simultánea y que fueron:

## Estudio comparativo de mapas de restricción

### Hibridaciones solapantes

- Por un lado se estudiaron los mapas de restricción de los clones pMJ y pFM (Figura 3.2) comparando las distancias entre los puntos de corte de las distintas endonucleasas de restricción en las dos clases de clones.

- Por otro lado se realizaron una serie de hibridaciones solapantes entre los fragmentos *Hind*III y los fragmentos *Eco*RI de los dos tipos de clones obtenidos (Figura 3.2). El principio de este procedimiento era muy sencillo: cada fragmento *Eco*RI que tuviera un punto de corte *Hind*III en su interior hibridaría con dos fragmentos *Hind*III, lo que indicaría que dichos fragmentos *Hind*III eran contiguos. Lo mismo ocurriría con los fragmentos *Hind*III que tuvieran un punto de corte *Eco*RI en su interior. Puesto que disponíamos de todos los fragmentos *Hind*III que representaban pFM82139 y nuestro objetivo era su ordenación, empleamos los fragmentos *Eco*RI como sondas. Así, los siete clones pMJ, que contienen todos los fragmentos *Hind*III de pFM82139, se digirieron con dicha enzima con el fin de separarlos del vector de clonación pBluescript SK y se hibridaron con sondas preparadas a partir de los insertos *Eco*RI de los clones pFM.

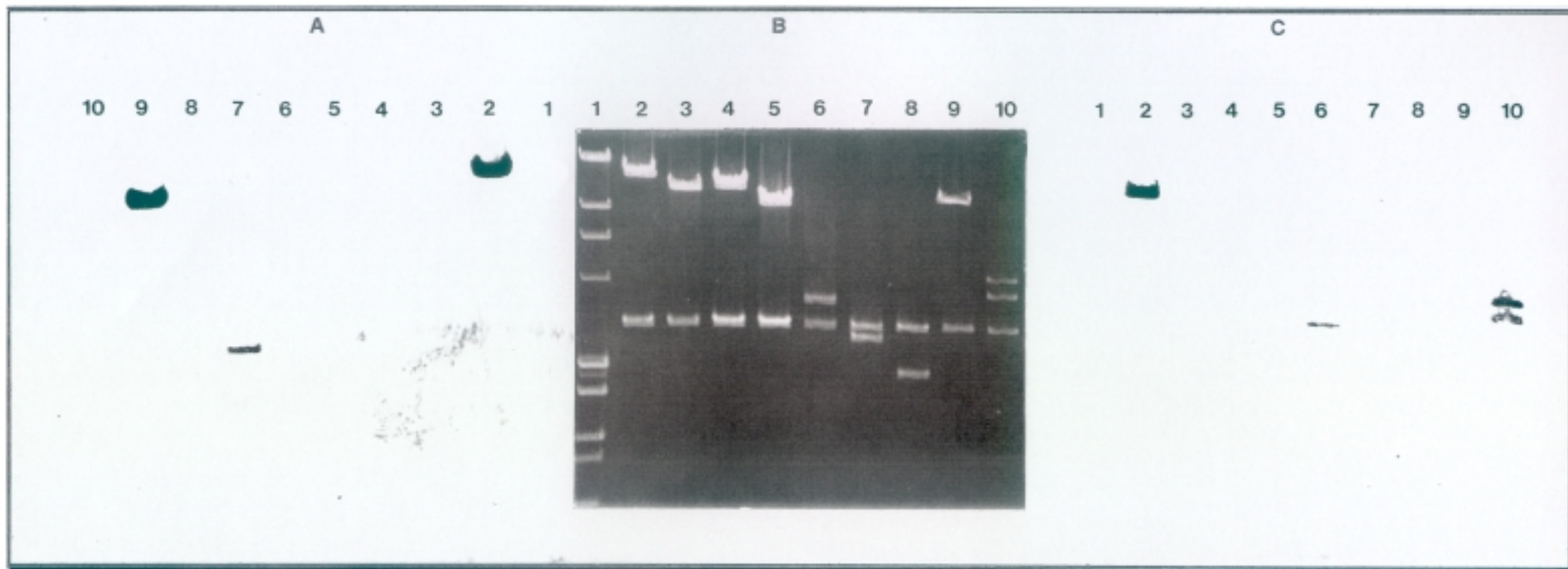
Se observó que el fragmento *Eco*RI de pFM003 hibridaba con los insertos *Hind*III de pMJ001 y de pMJ005 lo cual nos indicaba que ambos fragmentos *Hind*III eran contiguos (Figura 3.3).

El fragmento *Eco*RI de pFM024 hibridó con los fragmentos *Hind*III correspondientes a pMJ001 y pMJ004 (Figura 3.3) lo cual, junto al dato anterior, señalaba una ordenación pMJ005-pMJ001-pMJ004.

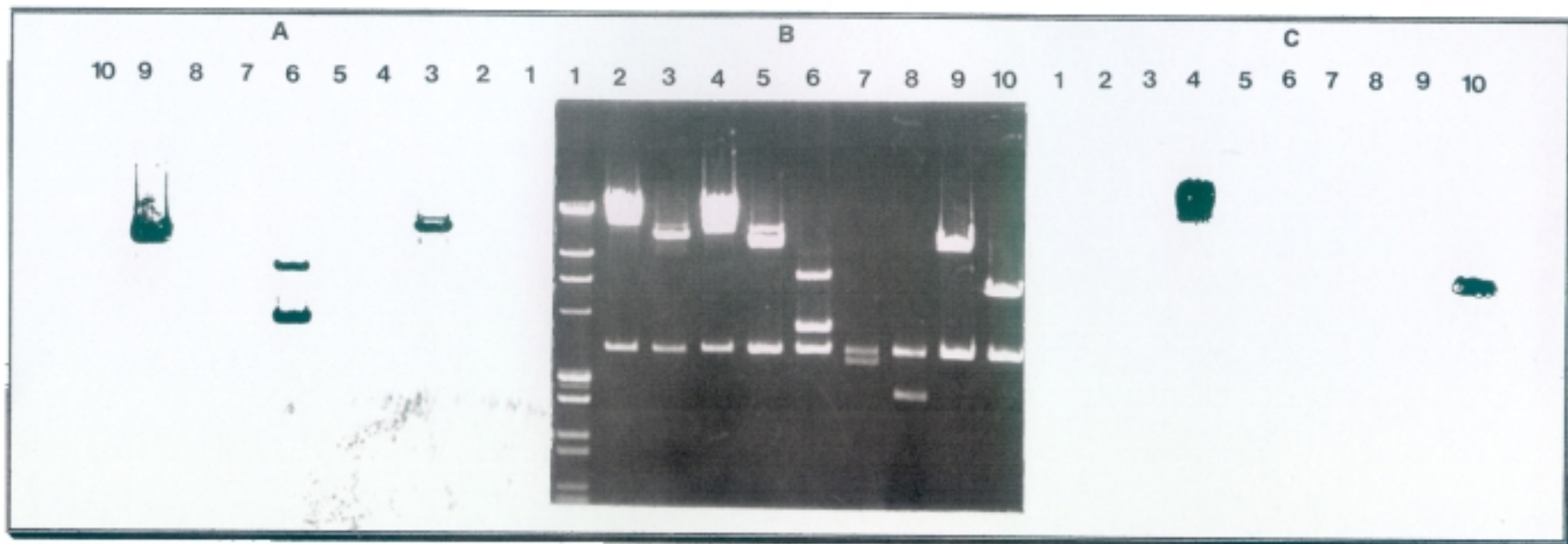
El inserto *Eco*RI de pFM004 hibridó con los fragmentos *Hind*III de pMJ004 y de pMJ002A (Figura 3.4), con lo cual la secuencia de fragmentos *Hind*III era pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A.

Los fragmentos *Eco*RI de pFM008 y pFM020 no ofrecieron información en cuanto al ordenamiento puesto que carecían de punto de corte *Hind*III en su interior. No obstante, se realizó su hibridación frente a los clones pMJ con el objeto de localizarlos. Se observó que ambos hibridaron con el inserto *Hind*III del clon pMJ002B. En la figura 3.4 se muestra la hibridación del fragmento *Eco*RI correspondiente al clon pFM008.

Restaban por situar 3 fragmentos *Hind*III y no se disponía ya de más clones pFM de donde obtener sondas *Eco*RI. La única posibilidad era la digestión de pFM82139 con *Eco*RI, la elución de las bandas *Eco*RI que no habían sido utilizadas aún como sondas y su empleo como tales. No obstante se descartó esta posibilidad por dos razones. Por un lado las bandas *Eco*RI que aparecían en el gel de agarosa y que restaban por emplear eran de muy pequeño tamaño (2,1, 1,3 y 1,2 kb) y la probabilidad de que albergaran un punto *Hind*III en su interior era escasa. Por otro lado, como ya se comentó anteriormente, puesto que la suma de las bandas *Eco*RI que se



**Figura 3.3.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pMJ001 (2), pMJ002A (3), pMJ002B (4), pMJ003 (5), pMJ004 (6), pMJ005 (7) y pMJ006 (8). En los carriles 9 y 10 DNA plasmídico digerido con *Eco*RI de los plásmidos pFM003 y pFM024 respectivamente. En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares número II y VI (ver Materiales ). (A) y (C) Hibridaciones del DNA empleando como sonda los fragmentos *Eco*RI marcados con digoxigenina de pFM003 y pFM024 respectivamente.



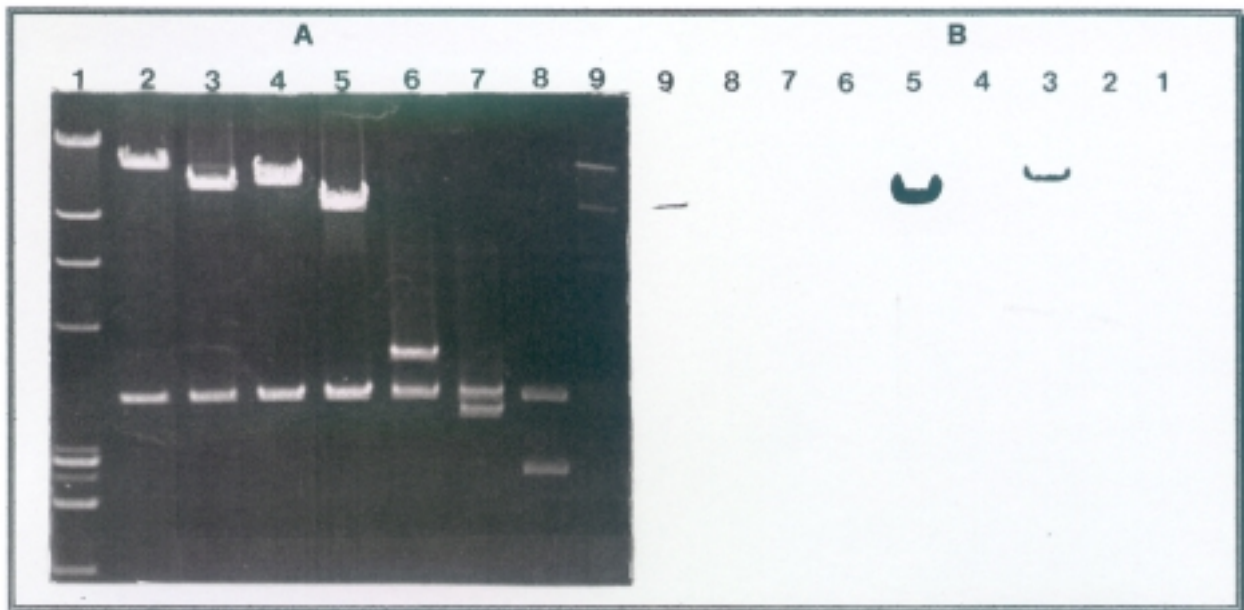
**Figura 3.4.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pMJ001 (2), pMJ002A (3), pMJ002B (4), pMJ003 (5), pMJ004 (6), pMJ005 (7) y pMJ006 (8). En los carriles 9 y 10 DNA digerido con *Eco*RI de los plásmidos pFM004 y pFM008 respectivamente. En el carril 1 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA empleando como sonda los fragmentos *Eco*RI marcados con digoxigenina de los plásmidos pFM004 y pFM008 respectivamente.

apreciaban en el gel de agarosa estaban lejos de alcanzar el tamaño total de pFM82139 de 60 kb, era muy posible que existiera más de un banda doble lo cual hacía demasiado dificultosa la clonación de las mismas o su elución para emplearlas como sondas. Por todo ello, para continuar situando los fragmentos *Hind*III mediante hibridaciones solapantes hubo que recurrir a otro tipo de sondas y se eligieron los fragmentos *Bam*HI. La digestión de pFM82139 con *Bam*HI da lugar a 4 fragmentos de tamaño bastante grande y cuya suma alcanza las 60 kb de pFM82139. Puesto que por el estudio de los mapas de restricción de los fragmentos *Hind*III que ya se tenían situados se sabía que las dos bandas *Bam*HI menores se encontraban incluidas dentro de los mismos (concretamente dentro de los fragmentos *Hind*III correspondientes a los clones pMJ004 y pMJ002A), se eluyeron únicamente las dos bandas mayores obtenidas. Se marcaron con digoxigenina y se enfrentaron a los fragmentos *Hind*III de cada uno de los clones pMJ. Dichas hibridaciones arrojaron nueva información. En una de ellas la segunda banda *Bam*HI, de aproximadamente 12 kb, hibridó con las bandas *Hind*III clonadas en pMJ002A y pMJ003 (Figura 3.5). Esto indicaba que el fragmento *Hind*III contiguo a pMJ002A era pMJ003, dando lugar a la ordenación: pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A-pMJ003. En la otra, la banda mayor *Bam*HI de pFM82139, de alrededor de 35 kb, hibridó con los fragmentos *Hind*III de pMJ001, pMJ002B, pMJ003, pMJ005 y pMJ006 (Figura 3.6). De esta forma se cerraba el círculo que constituían los fragmentos *Hind*III en pFM82139 puesto que esta banda grande *Bam*HI hibridaba con los fragmentos *Hind*III que se encontraban en los extremos de la ordenación obtenida hasta el momento, es decir los correspondientes a pMJ005 y a pMJ003.

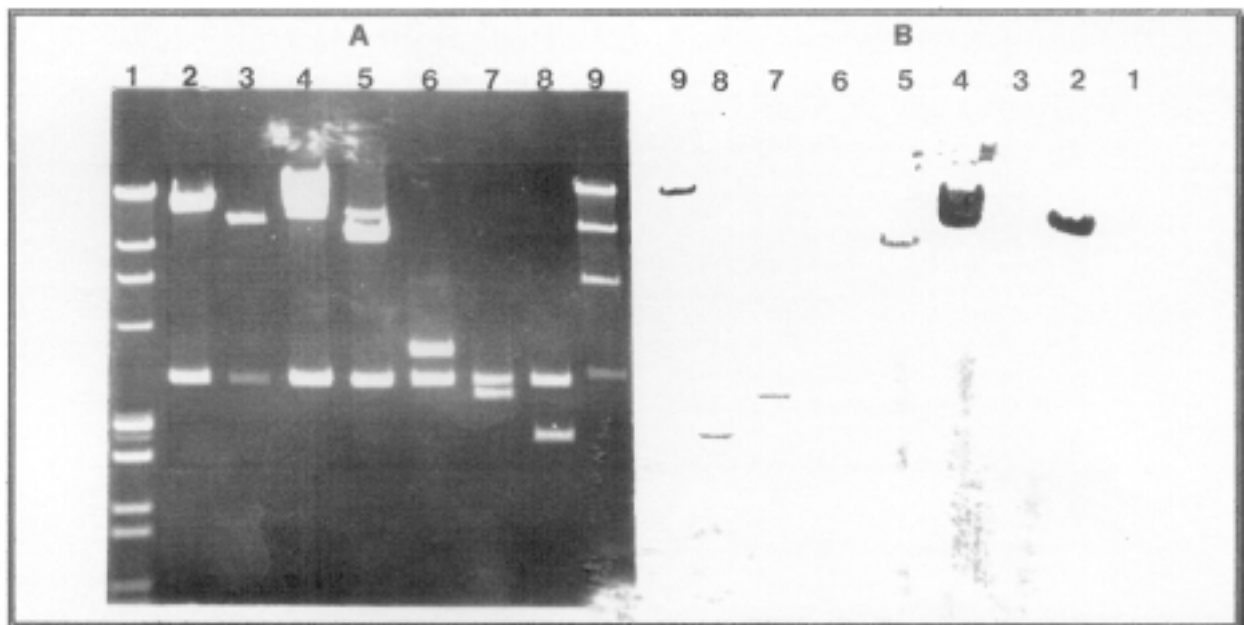
No obstante, quedaban aún por situar los fragmentos *Hind*III incluidos en pMJ006 y en pMJ002B. Se sabía que estaban entre pMJ005 y pMJ003, pero no su posición relativa. Para localizarlos fue necesario recurrir al estudio comparativo entre los fragmentos producidos por la digestión de pFM82139 con las distintas endonucleasas empleadas en el cartografiado y los fragmentos que se obtendrían al utilizar esas mismas enzimas sobre la ordenación de los distintos fragmentos *Hind*III predicha por nosotros. Pero para realizar esta comparación era imprescindible conocer la orientación relativa adoptada por cada uno de los fragmentos *Hind*III ya ordenados.

### **3.1.6.- Orientación relativa de los fragmentos *Hind*III correspondientes a los clones pMJ005, pMJ001, pMJ004, pMJ002A y pMJ003.**

Una vez ordenados estos cinco fragmentos *Hind*III se procedió, como se ha dicho, a la orientación relativa de los mismos. Para lograr esto se estudiaron los tamaños de los fragmentos obtenidos al digerir el plásmido con las endonucleasas de restricción empleadas en su cartografiado: *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Sal*I, *Xba*I y *Xho*I y se compararon con los fragmentos que se obtendrían al digerir los distintos clones pMJ, ordenados de la forma ya citada, en las dos



**Figura 3.5.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 0,7% del DNA digerido con *Hind*III de pMJ001 (2), pMJ002A (3), pMJ002B (4), pMJ003 (5), pMJ004 (6), pMJ005 (7) y pMJ006 (8). En el carril 9 pFM82139 digerido con *Bam*HI y en el carril 1 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el segundo fragmento mayor en tamaño de pFM82139 digerido con *Bam*HI.



**Figura 3.6.-** (A) Análisis electroforético en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pMJ001 (2), pMJ002A (3), pMJ002B (4), pMJ003 (5), pMJ004 (6), pMJ005 (7) y pMJ006 (8). En el carril 9 DNA plasmídico de pFM82139 digerido con *Bam*HI y en el carril 1 patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento mayor en tamaño de pFM82139 digerido con *Bam*HI.

orientaciones posibles. De esta forma se disponía ya de cinco fragmentos *HindIII* ordenados y orientados y se podía afrontar la colocación de los otros dos fragmentos *HindIII* restantes correspondientes a pMJ006 y a pMJ002B.

### 3.1.7.- Ordenación de pMJ006 y pMJ002B.

Para situarlos se emplearon dos procedimientos. Por un lado se procedió a efectuar el estudio comparativo entre patrones de restricción ya comentado. Así, se realizó un estudio del tamaño de los fragmentos obtenidos al digerir el plásmido pFM82139 con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *SaII* por separado. Al comparar dichos tamaños con los que se obtendrían empleando las mismas enzimas sobre la ordenación de fragmentos *HindIII* ya colocados y orientados y sobre los dos fragmentos *HindIII* correspondientes a pMJ002B y a pMJ006 (en las dos posiciones y orientaciones posibles), se llegó a la conclusión de que contiguo a pMJ003 se encontraba situado pMJ002B y a continuación pMJ006. De esta forma no sólo se consiguió situar los dos fragmentos, sino también conocer la orientación relativa del fragmento *HindIII* de pMJ002B

La orientación del fragmento *HindIII* correspondiente a pMJ006 no se consiguió ya que la única enzima de las empleadas en el cartografiado que corta en su interior, que es *SaII*, lo dividía prácticamente en dos partes iguales.

Otro experimento que se efectuó de forma paralela para confirmar este ordenamiento fue un ensayo de hibridación. Se utilizó como sonda el fragmento extremo de 1,3 kb *EcoRI* de pMJ002B, que debía formar parte de un fragmento *EcoRI* mayor, y se enfrentó al DNA de pFM82139 digerido con *EcoRI*. Dicha sonda hibridó con una banda *EcoRI* de aproximadamente 5,7 kb, de la que se conocía, por análisis de restricción, que era doble. Uno de los fragmentos *EcoRI*, que formaba parte de esa doble banda y que constituía el clon pFM008, por hibridación y análisis por restricción se sabía que estaba situado dentro del clon pMJ002B. Dicha banda de 1,3 kb no hibridó, como era lógico esperar, con la banda *EcoRI* de 5,7 kb correspondiente a pFM008. La hibridación del fragmento *EcoRI* de 1,3 kb con la banda *EcoRI* de 5,7 kb solamente se podía explicar, teniendo en cuenta los fragmentos *EcoRI* a los que daba lugar pFM82139, si entre pMJ002B y pMJ005 se encontraba pMJ006. Otro experimento de hibridación que confirmó este resultado fue que el fragmento *HindIII* de 2 kb correspondiente a pMJ006 hibridó con la misma banda *EcoRI* de 5,7 kb.

De esta forma se estableció que la secuencia final de fragmentos era: pMJ005-pMJ001-pMJ004-pMJ002A-pMJ003-pMJ002B-pMJ006.

### 3.1.8.- Orientación del fragmento *HindIII* de pMJ006.

La orientación del fragmento *HindIII* del clon pMJ002B ya se había conseguido anteriormente a la vez que se había logrado su colocación.

La orientación del fragmento de 2 kb *HindIII* correspondiente al clon pMJ006 fue más problemática puesto que, como ya se comentó anteriormente, la única enzima de las empleadas en el cartografiado que tenía punto de corte en su interior, *SaI*, lo dividía prácticamente en dos partes iguales. Esto hacía imposible su orientación basándonos únicamente en la comparación de los tamaños de los siete fragmentos *SaI* de pFM82139 con los fragmentos *SaI* que obtendríamos tras la ordenación de los restantes clones pMJ. Es por ello que hubo que recurrir a la realización de un ensayo de hibridación utilizando como sondas dos fragmentos de dicho inserto obtenidos a cada lado del punto *SaI* y después de enfrentárlas a pFM82139 digerido con *SaI* ver cuál de ellas hibridaba con el fragmento *SaI* de aproximadamente 7,5 kb, que contenía el fragmento completo *HindIII* de pMJ005 y parte del de pMJ001, y cuál con el de aproximadamente 8 kb, que englobaba prácticamente la mitad del fragmento *HindIII* de pMJ002B, que eran los dos fragmentos *SaI* que compartía pMJ006. Fue de gran utilidad para poder obtener dichas sondas la existencia de un punto de corte *ClaI* dentro del fragmento *HindIII* de pMJ006. Así, una de ellas estaba constituida por el fragmento *SaI-ClaI* y medía 550 pb y la otra por el fragmento *SaI-HindIII* que cubría la mitad del inserto, de aproximadamente 1 kb. Se comprobó que la sonda que hibridaba con el fragmento de 7,5 kb era la constituida por el fragmento *SaI-ClaI* y la que hibridaba con el fragmento de 8 kb era la sonda *SaI-HindIII* de lo que se dedujo que el extremo del fragmento *HindIII* de 2 kb contiguo a pMJ005 era el que poseía el punto de corte *ClaI*.

El hecho de que el fragmento *SaI-ClaI* hibridara con una banda *SaI* de pFM501, plásmido de virulencia de *S. typhimurium* empleado en este trabajo, idéntica en tamaño a la de pFM82139 y que el fragmento *SaI-HindIII* lo hiciera con una mayor se interpretará en el siguiente apartado.

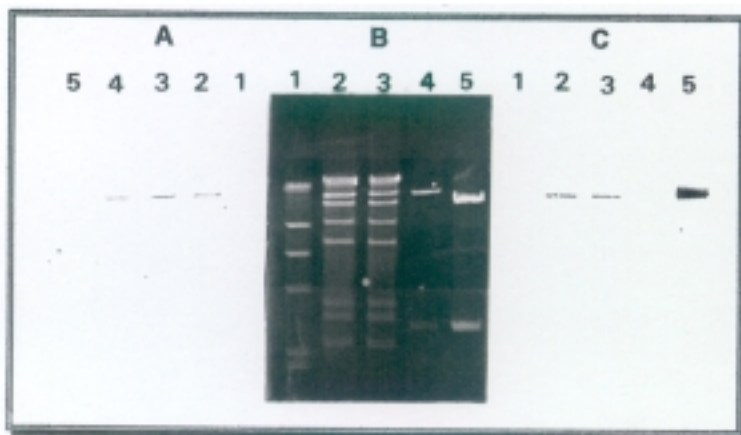
El mapa de restricción definitivo de pFM82139 se detalla en las figuras 3.2 y 3.12.

### **3.2.- Homología con el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*.**

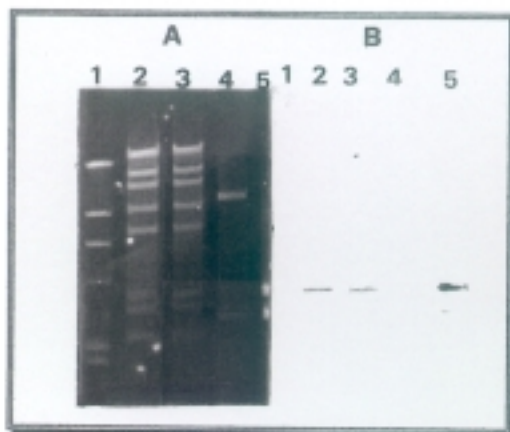
Una vez realizado el cartografiado completo del plásmido pFM82139 de *S. enteritidis* se planteó el objetivo de estudiar la homología existente entre dicho plásmido y el plásmido de virulencia de 91 kb de *S. typhimurium* cuyo mapa de restricción había sido publicado (Tinge y Curtiss III, 1990a).

Para ello se recurrió a la realización de ensayos de hibridación entre los fragmentos *HindIII* de pFM82139 y los fragmentos *HindIII* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Previamente se compararon los tamaños de los fragmentos *HindIII* de pFM501, obtenido de nuestra cepa de *S. typhimurium* JR501, con los publicados por otros autores para el plásmido de virulencia pStSR100 originario de otra cepa de *S. typhimurium*. Se comprobó que el patrón de restricción obtenido con *HindIII* en nuestro plásmido era indistinguible del publicado para pStSR100 (Tinge y Curtiss III, 1990a).

Para realizar este estudio se prepararon una serie de sondas a partir de los fragmentos *Hind*III de pFM82139 clonados en pBluescript SK (pMJ), de los que ya se tenía certeza de su origen plasmídico, y se enfrentaron al DNA del plásmido de virulencia pFM501 de la cepa de *S. typhimurium* JR501 digerido con *Hind*III, poniendo en cada caso como control positivo el DNA del correspondiente clon pMJ digerido con dicha enzima (Figuras 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11).



**Figura 3.7-** (B) Electroforesis en gel de agarosa del 1% de la digestión con *Hind*III de pFM501 (2) y (3), pMJ001 (4) y pMJ002A (5). En el carril 1, patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C). Hibridaciones del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Hind*III de pMJ001 y pMJ002A, respectivamente.



**Figura 3.8.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 1% de la digestión con *Hind*III de pFM501 (2) y (3), pMJ003 (4) y pMJ004 (5). En el carril 1, patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Hind*III de pMJ004.

Los fragmentos *Hind*III correspondientes a los clones pMJ001, pMJ002A y pMJ004 hibridaron con bandas *Hind*III de pFM501 de idéntico tamaño. Curiosamente, los insertos *Hind*III de estos cuatro clones son contiguos en el mapa de pFM82139 lo cual indicaba una gran conservación de la secuencia en esta zona de los plásmidos de ambos serotipos. No obstante, comparando los mapas de restricción de estos fragmentos *Hind*III de pFM82139 con los de los fragmentos homólogos de pFM501 se observaron algunas diferencias en los mismos, en cuanto a aparición y desaparición de puntos de corte de las distintas enzimas utilizadas. El fragmento *Hind*III de 2,7 kb

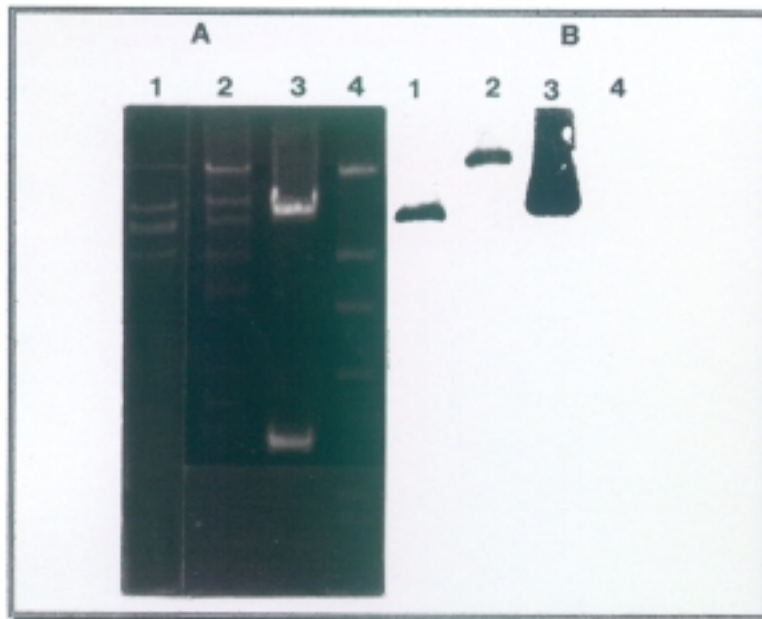


Figura 3.9

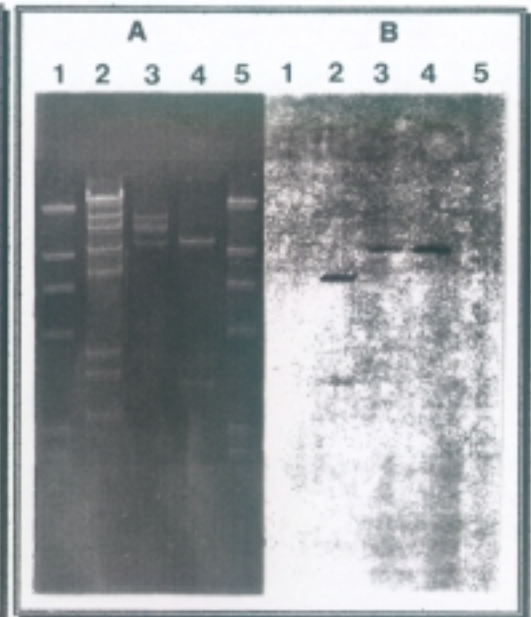
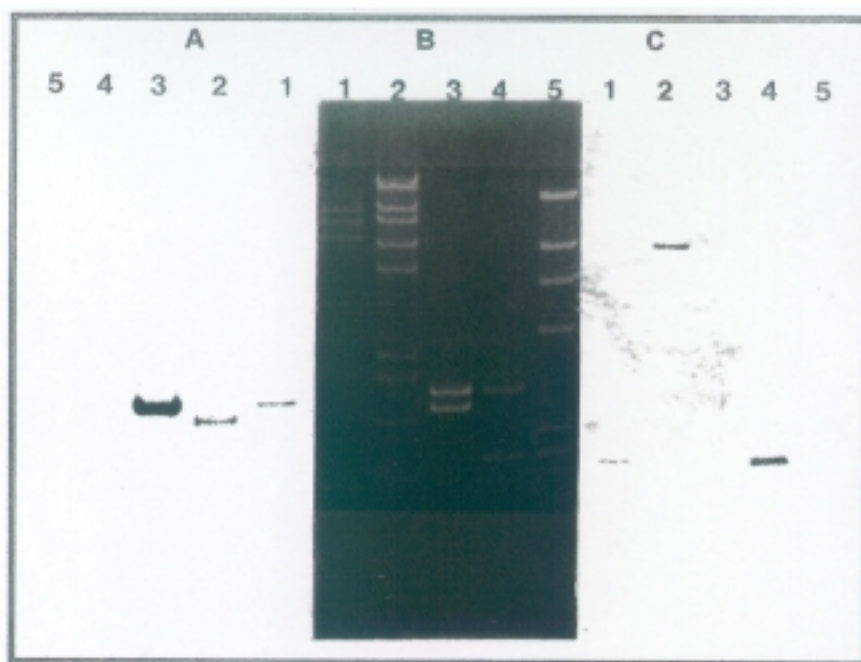


Figura 3.10

**Figura 3.9.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pFM82139 (1), pFM501 (2) y pMJ002B (3). En el carril 4 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento *Hind*III del plásmido pMJ002B marcado con digoxigenina.

**Figura 3.10.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pFM501 (2), pFM82139 (3) y pMJ003 (4). En los carriles 1 y 5 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento *Hind*III del plásmido pMJ003 marcado con digoxigenina.

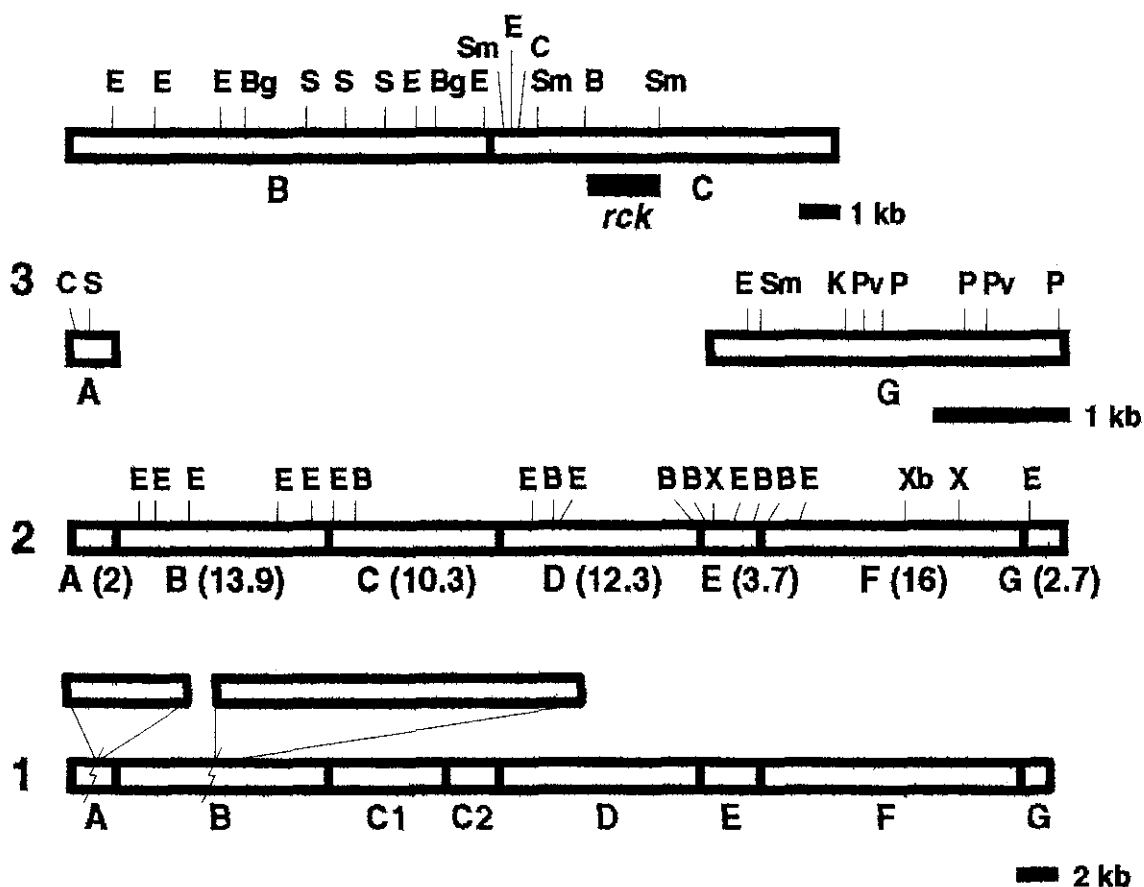


**Figura 3.11.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del DNA plasmídico digerido con *Hind*III de pFM82139 (1), pFM501 (2), pMJ005 (3) y pMJ006 (4). En el carril 5 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C) Hibridaciones del DNA utilizando como sonda los fragmentos *Hind*III marcados con digoxigenina de los plásmidos pMJ005 y pMJ006, respectivamente.

correspondiente a pMJ005 hibridó con un fragmento *Hind*III del plásmido de 91kb de un tamaño 200 pb menor. A fin de ver dónde se había producido la diferencia, se estudiaron los puntos de corte de otras enzimas no empleadas en el cartografiado del fragmento *Hind*III de pMJ005 y se compararon con los correspondientes puntos de corte para esas enzimas en la zona homóloga del plásmido de *S. typhimurium*. Se observó la desaparición en pFM82139 de un punto de corte *Hind*III, que en el plásmido de 91 Kb daba lugar a una banda de 200 pb y que en pFM82139 hizo aumentar el fragmento *Hind*III correspondiente a pMJ005 en 200 pb. Posteriormente se analizó por restricción el clon pFM003, que comprendía esta zona extrema de pMJ005, y se confirmó la desaparición del punto de corte *Hind*III. Puesto que el patrón de restricción del inserto *Hind*III de pMJ005 era muy similar (con la excepción de la desaparición del punto de corte *Hind*III y de otro *EcoRV*) a la de la zona homóloga de pFM501, podíamos suponer que la conservación de la secuencia entre ambos plásmidos de virulencia se mantenía hasta esta zona.

Cada uno de los fragmentos *Hind*III de pFM82139 correspondientes a los clones pMJ002B y pMJ006, también contiguos, hibridaron con sendos fragmentos *Hind*III de mayor tamaño de pFM501, siendo la diferencia de aproximadamente 22 y 8 kb respectivamente, lo que indicaba la existencia de una posible delección en esta zona del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, ya apuntada por Montenegro *et al.* (1991), y que daba cuenta de las 30 kb de diferencia entre ambos plásmidos. El hecho comentado en el apartado anterior de la hibridación de DNA proveniente del fragmento *Sal*I/*Cla*I de pMJ006 contiguo a pMJ005 con bandas *Sal*I de pFM501 y pFM82139 de idéntico tamaño y de la hibridación de DNA del otro extremo con una banda *Sal*I de pFM501 de gran tamaño y con otra menor de pFM82139 delimitaba aun más la extensión de dicha delección. Así, se podía aseverar que la región más conservada de pFM82139 con respecto a pFM501 llegaba hasta el punto de corte *Sal*I del fragmento *Hind*III de pMJ006 e incluía los fragmentos *Hind*III vecinos a este correspondientes a pMJ005, pMJ001, pMJ004 y pMJ002A.

El inserto *Hind*III de pMJ003 hibridó con dos fragmentos *Hind*III de menor tamaño del plásmido de *S. typhimurium* JR501, cuya suma era igual a la del fragmento correspondiente de pFM82139. Al analizar los mapas de restricción de ambas zonas, fue fácil deducir que lo que había ocurrido era la desaparición de un punto de corte *Hind*III en pFM82139. Aunque se encontró una mayor diferencia en el patrón de restricción de dichas zonas que el encontrado en el caso de pMJ005 y su fragmento homólogo de pFM501, se consideró que se podía incluir este fragmento *Hind*III dentro de los pertenecientes a la zona más conservada de pFM82139 (Figura 3.12).



**Figura 3.12.-** Mapas de restricción de los plásmidos pFM501 (1) y pFM82139 (2) que muestran los fragmentos *Hind*III. Los números entre paréntesis indican el tamaño de los fragmentos en kb; los rectángulos situados sobre el mapa del plásmido de *S. typhimurium* representan las regiones no homólogas contenidas en esos fragmentos, pero no su localización exacta. (3) Mapa detallado de los fragmentos A (pMJ006), B (pMJ002B), C (pMJ003) y G (pMJ005) del plásmido de *S. enteritidis*. Los fragmentos D, E y F de pFM82139 corresponden a los clones pMJ002A, pMJ004 y pMJ001 respectivamente. El rectángulo sombreado situado bajo el fragmento C señala la homología con la sonda *rck* (como se explicará más adelante). Los puntos de corte de las distintas endonucleasas de restricción empleadas se indican con las letras: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; C, *Cl*I; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xho*I; Xb, *Xba*I (Buisán *et al.*, 1994).

### **3.3.- Mapa génico del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*.**

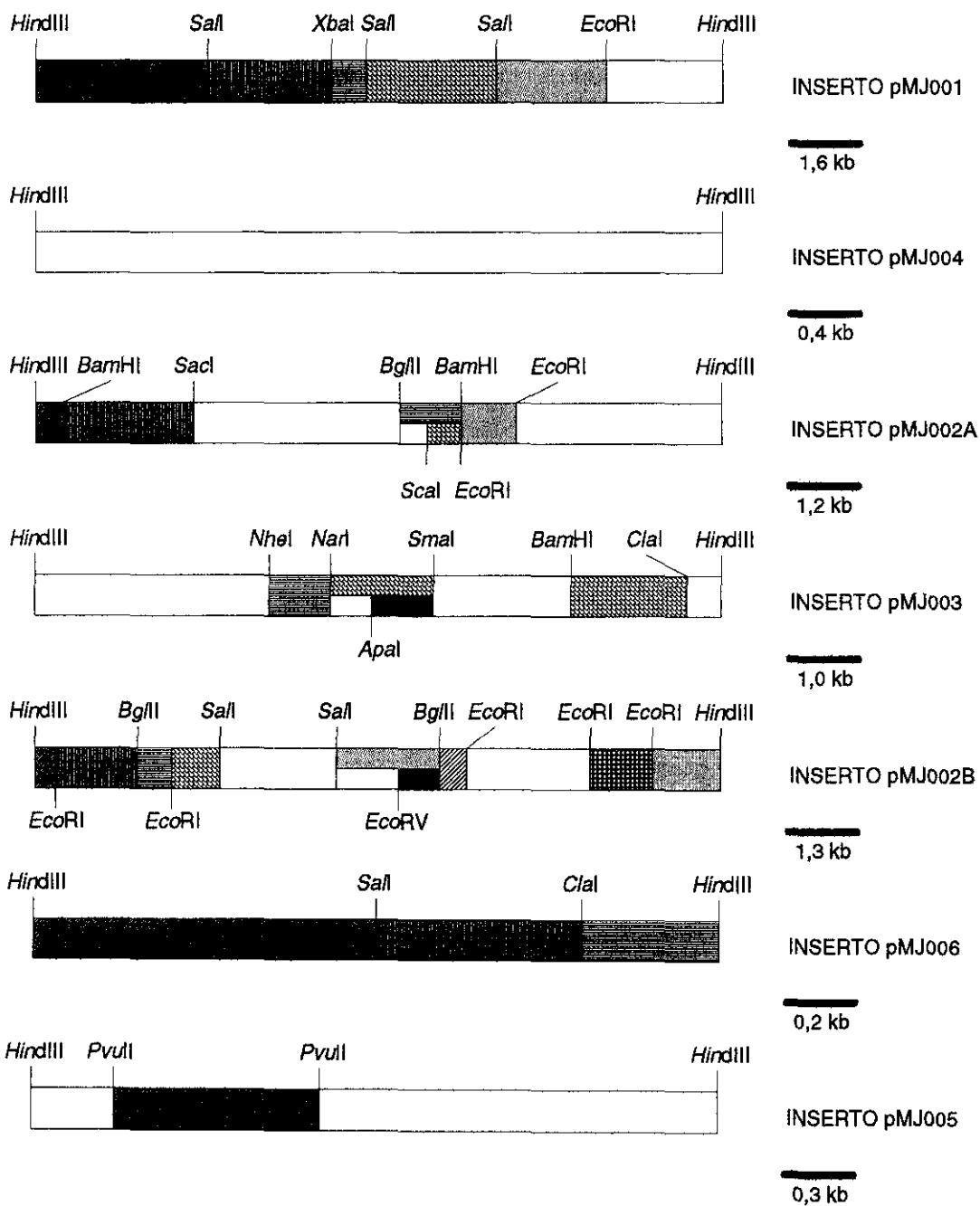
Dedido a la escasez de datos publicados del plásmido de *S. enteritidis* y a la dispersión de los descritos en los plásmidos homólogos más caracterizados, pareció oportuno proceder a la obtención del mapa génico del plásmido que nos ocupa. En todos los casos el proceso se realizó mediante la secuenciación parcial de subclones procedentes de la genoteca inicial plasmídica *HindIII*, excepto en los casos de la detección de dos de los genes implicados en la resistencia al suero donde se empleó la técnica de amplificación por PCR e hibridación.

#### **3.3.1.- Subclonación de las construcciones pMJ.**

Se procedió a la subclonación de diversos fragmentos de las siete construcciones pMJ (*HindIII*) que inicialmente se obtuvieron en la clonación de pFM82139. Este paso se hizo fundamentalmente para obtener construcciones de un tamaño apropiado para poder ser secuenciadas de manera eficaz. Se empleó como vector de clonación el plásmido pBluescript SK utilizando el proceso de clonación indicado en puntos anteriores. Las nuevas construcciones se diseñaron de manera que el plásmido quedase representado en el mayor porcentaje posible, para garantizar la posterior obtención de un mapa génico representativo. Se hizo especial hincapié en las regiones plasmídicas que permanecen prácticamente desconocidas en los plásmidos de los distintos serotipos. Los fragmentos utilizados para obtener las nuevas construcciones y su localización en pFM82139 se encuentran representadas en la Figura 3.13. En el caso de la construcción pMJ006, al corresponder a una de las regiones divergentes con respecto al plásmido de *S. typhimurium*, pareció interesante proceder a su secuenciación completa. Para ello, a parte de las subclonaciones obtenidas y debido a la falta de puntos de corte para endonucleasas de restricción en esa zona que fueran válidos para su subclonación en fragmentos aún menores, fue necesario realizar en el subclón que contenía el inserto *HindIII/SalI* (1 kb) deleciones seriadas desde el extremo *HindIII* (colindante con pMJ002B), empleando como extremo sensible *HindIII* y como resistente *PstI* (perteneciente al *polylinker* del vector) (ver Métodos).

#### **3.3.2.- Secuenciación parcial de los subclones procedentes de las construcciones pMJ.**

La secuenciación automática del DNA se llevó a cabo como se indica en el capítulo de Métodos, a partir de los extremos del vector de clonación mediante los iniciadores comerciales *universal primer* y/o *reversal primer*, según las circunstancias. Los resultados obtenidos se refieren a una sola cadena de DNA, salvo cuando se indique.



**Figura 3.13.-** Esquema de los subclones obtenidos a partir de las construcciones pMJ. A la derecha se indica la construcción a la corresponde el inserto representado. En la figura únicamente se muestran los puntos de corte para endonucleasas de restricción utilizadas en las subclonaciones. Los espacios en blanco señalan fragmentos no empleados en el proceso de secuenciación.

### 3.3.3.- Análisis de las secuencias obtenidas.

Las secuencias de DNA de todas las construcciones tras su correspondiente tratamiento informático, fueron comparadas en bancos de secuencias internacionales mediante los programas FASTA (DNA) y BLAST (DNA y proteína). A partir de los resultados de homología obtenidos se pudieron localizar y situar en el plásmido de *S. enteritidis* los genes, grupos de genes, o marcos abiertos de lectura anteriormente secuenciados en otros plásmidos homólogos, así como secuencias no descritas en ningún plásmido de virulencia hasta el momento. Las secuencias que no presentaron homología representativa con alguna otra depositada en banco de secuencias fueron enfrentadas a bancos de proteínas empleando el programa BLASTX (que traduce la secuencia nucleotídica en los seis marcos posibles) sin encontrar en ninguno de los casos homología resaltable. La importancia de los datos que a continuación se van a describir radica en que son los únicos disponibles basados en la secuencia del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, a excepción de los del operón *spv* (Suzuki *et al.*, 1994).

### 3.3.4.- Descripción de los resultados de homología.

El sistema elegido para la explicación de los resultados obtenidos ha sido en forma de tabla, indicando: A.-subclón al que pertenece la secuencia indicando el tamaño del inserto clonado en pBluescript SK y la construcción pMJ de procedencia, B.-tamaño de la región secuenciada indicando entre paréntesis el extremo secuenciado, C.-porcentaje de homología (%) con secuencias presentes en banco de datos (en caso negativo aparecería representada con el símbolo "--"), y D.- gen o región al que pertenece la secuencia homóloga, indicando entre paréntesis su tamaño, junto con las aclaraciones oportunas.

El orden de los subclones citados va a ser el contrario al de las agujas del reloj empezando desde los procedentes de pMJ001 y tomando como referencia la distribución de los insertos de las construcciones pMJ en pFM82139 que se representa en la Figura 3.13. Se citarán las secuencias con mayor homología, indicando otras adicionales a la principal cuando se consideren de interés para el entendimiento de los resultados. En los casos en que dentro de un misma secuencia aparezcan zonas internas que presenten homologías con más de un gen, a continuación del total secuenciado desde el extremo indicado se desglosarán el número de nucleótidos que presentan homología con cada secuencia específica y su correspondiente porcentaje de homología, realizándose los comentarios oportunos en la columna D.

Como norma general los fragmentos citados fueron ligados al vector pBluescript SK digerido con esas mismas enzimas de restricción, exceptuando los casos en los que las endonucleasas de restricción empleadas para obtener dichos fragmentos estaban ausentes en el *polylinker* del vector; en estos supuestos se emplearon para digerir el vector otras enzimas que dieran lugar a extremos compatibles para llevar a cabo la ligación. De esta manera el extremo compatible

empleado para *NarI* fue *ClaI*, *XbaI* para *NheI*, *BamHI* para *BglII*, *EcoRV* para *PvuII* y *SmaI* para *Scal*. La representación de las secuencias homólogas detectadas en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* se muestran en la Figura 3.14.

A.- SUBCLÓN	B.- SECUENCIADO	C.-%	D.- HOMOLOGÍA CON
<i>HindIII/SalI</i> 3,9 kb. pMJ001	270 pb ( <i>SalI</i> )	90	<i>t1pA</i> (1113 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Koski <i>et al.</i> , 1992).
<i>SalI/XbaI</i> 2,8 kb pMJ001	305 pb ( <i>SalI</i> )	95	<i>t1pA</i> (Koski <i>et al.</i> , 1992).
	216 pb ( <i>XbaI</i> )	--	Sin homología representativa.
<i>XbaI/SalI</i> 800 pb pMJ001	381 pb ( <i>XbaI</i> )	--	Sin homología representativa.
	307 pb ( <i>SalI</i> )	--	Sin homología representativa.
<i>SalI/SalI</i> 3,1 kb pMJ001	315 pb ( <i>SalI</i> )	--	Sin homología representativa.
	217 pb ( <i>SalI</i> )	95	Secuencia de inserción tipo IS630 (1052 pb) del plásmido de <i>S. dublin</i> (Krause <i>et al.</i> , 1991b).
<i>SalI/EcoRI</i> 2,5 kb pMJ001	249 pb ( <i>EcoRI</i> )	65	IS630 (1159 pb) de <i>Shigella sonnei</i> (Matsutani <i>et al.</i> , 1987).
		98	Extremo 3' de <i>spvR</i> (891 pb) y región intergénica <i>spvR/A</i> (520 pb) de los plásmidos de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Norel <i>et al.</i> , 1989a), <i>S. dublin</i> (Krause <i>et al.</i> , 1991a), <i>S. choleraesuis</i> (Matsui <i>et al.</i> , 1993) y <i>S. enteritidis</i> (Suzuki <i>et al.</i> , 1994).
pMJ004			No estudiado. Resto del operón <i>spv</i> (Suzuki <i>et al.</i> , 1994).
<i>HindIII/BamHI</i> 450 pb pMJ002A	450 pb (íntegro)	--	Sin homología representativa.
<i>BamHI/SacI</i> 2,3 kb pMJ002A	250 pb ( <i>BamHI</i> )	--	Sin homología representativa.
	246 pb ( <i>SacI</i> )	88	Resolvasa ( <i>rsd</i> , 780 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. dublin</i> (Krause y Guiney, 1991).
<i>BglII/BamHI</i> 1,2 kb pMJ002A	378 pb ( <i>BglII</i> )	--	Sin homología representativa.
<i>Scal/EcoRI</i> 614 pb pMJ002A	614 pb (íntegro)	73	Región de replicación RepFIB (1758 pb) del plásmido pColV-K30 (Pérez-Casal <i>et al.</i> , 1989), denominada <i>repC</i> en el plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> .

	66 pb	100	Próximo al extremo <i>Scal</i> se ha localizado <i>rsk</i> (66 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Vandenbosch <i>et al.</i> , 1989a).
<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI 1,1 kb pMJ002A	407 pb ( <i>Eco</i> RI) 76 pb 134 pb 197pb	-- 82 93	Inicialmente en dirección <i>Bam</i> HI→ <i>Eco</i> RI, zona no homóloga (76 pb). Después, 134 pb homólogas a replicón tipo RepFIB (Saul <i>et al.</i> , 1989), y finalmente 197 pb que continuarían teóricamente más allá del punto <i>Eco</i> RI, homólogas a una zona no codificante del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
<i>Nhe</i> I/ <i>Nar</i> I 900 pb pMJ003	294 pb ( <i>Nhe</i> I) 269 pb ( <i>Nar</i> I)	-- 94	Sin homología representativa. Final de <i>pefI</i> (213 pb) e inicio del <i>orf7</i> (351 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (zona de genes relacionados con síntesis de fimbrias) (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
<i>Nar</i> I/ <i>Sma</i> I 1,5 kb pMJ003	238 pb ( <i>Nar</i> I)	93	Final del <i>orf7</i> y zona intergénica <i>orf7/orf8</i> del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
<i>Apa</i> I/ <i>Sma</i> I 900 pb pMJ003	309 pb ( <i>Apa</i> I) 177 pb ( <i>Sma</i> I)	97 99	<i>orf8</i> (654 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993). <i>orf9</i> (900 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
<i>Bam</i> HI/ <i>Cla</i> I 1,8 kb pMJ003	155 pb ( <i>Bam</i> HI) 131 pb  219 pb ( <i>Cla</i> I)	95 95 80	Región intergénica entre <i>orf11</i> del plásmido de virulencia <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993) y el replicón <i>repB</i> . Las 131 pb indicadas denotan parte de una región repetida invertida (206 pb) con respecto a otra presente en el extremo 3' del <i>orf9</i> y la región intergénica anteriormente citada, confirmándose su conservación en <i>S. enteritidis</i> . Replicón IncFII (1883 pb) del plásmido pYVe439-80 de <i>Yersinia enterocolitica</i> (Vanooteghem y Cornelis, 1990). En el plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> denominado <i>repB</i> .

<i>HindIII/EcoRI</i> 400 pb pMJ002B	178 pb ( <i>HindIII</i> )	75	Principio de <i>repB</i> , homología con replicón IncFII del plásmido pYVe439-80 (Vanooteghem y Cornelis, 1990).
	160 pb ( <i>EcoRI</i> )	50	Endonucleasa <i>nuc</i> (534 pb) del plásmido pKM101 (Pohlman <i>et al.</i> , 1993).
<i>EcoRI/BglII</i> 1,5 kb pMJ002B	260 pb ( <i>EcoRI</i> )	53	Endonucleasa <i>nuc</i> del plásmido pKM101 (Pohlman <i>et al.</i> , 1993).
	310 pb ( <i>BglII</i> )	71	<i>finO</i> (561 pb) región de transferencia de plásmidos IncF (Frost <i>et al.</i> , 1994).
<i>BglII/EcoRI</i> 563 pb pMJ002B	563 pb (íntegro)	73	<i>traV</i> (513 pb) del operón de transferencia del plásmido F de <i>E. coli</i> (Frost <i>et al.</i> , 1994).
<i>EcoRI/SalI</i> 964 pb pMJ002B	241 pb ( <i>EcoRI</i> )	61	Inicio de <i>traV</i> del plásmido F (Frost <i>et al.</i> , 1994).
	253 pb ( <i>SalI</i> )	70	Parte final de <i>traB</i> (1425 pb) e inicial de <i>traP</i> (588 pb) del operón de transferencia del plásmido F (Frost <i>et al.</i> , 1994).
<i>SalI/BglII</i> 1,9 kb pMJ002B	221 pb ( <i>SalI</i> )	84	<i>traE</i> (564 pb) del operón de transferencia del plásmido R1 (Koraimann y Högenauer, 1989) y del plásmido F (Frost <i>et al.</i> , 1994).
<i>EcoRV/BglII</i> 850 pb pMJ002B	493 pb ( <i>EcoRV</i> )	79	Parte final de <i>traJ</i> (603 pb) e inicial de <i>traY</i> (225 pb) del operón de transferencia del plásmido R1-19 (Finlay <i>et al.</i> , 1986). Similar homología con <i>traY</i> del plásmido ColB4-K98 (Finlay <i>et al.</i> , 1986a).
	242 pb ( <i>BglII</i> )	79	<i>traJ</i> del operón de transferencia del plásmido R1-19 (Finlay <i>et al.</i> , 1986).
<i>BglII/EcoRI</i> 473 pb pMJ002B	473 pb (íntegro)	75	Región 3' <i>traM</i> (381 pb), <i>finP</i> y extremo 5' de <i>traJ</i> del operón de transferencia de plásmidos tipo IncF (Frost <i>et al.</i> , 1994; Finlay <i>et al.</i> , 1986).
<i>EcoRI/EcoRI</i> 1,2 kb pMJ002B	316 pb ( <i>EcoRI</i> )	--	Sin homología representativa.
	288 pb ( <i>EcoRI</i> )	--	Sin homología representativa.
<i>EcoRI/HindIII</i> 1,3 kb pMJ002B	182 pb ( <i>EcoRI</i> )	--	Sin homología representativa.
	200 pb ( <i>HindIII</i> )	--	Sin homología representativa.
<i>HindIII/HindIII</i> 1960 pb <i>HindIII/SalI</i> (1 kb)	1960 pb (íntegro)		
	665 pb ( <i>HindIII</i> ) Colindante con	--	Sin homología representativa.



### 3.3.5.- Localización de algunos genes implicados en la resistencia al suero en los plásmidos de virulencia de *S. typhimurium* y *S. enteritidis* .

Se planteó la localización de genes plasmídicos que habían sido implicados en la virulencia de otros serotipos de *Salmonella* y que no habían sido situados en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* de manera exacta. Para llevar a cabo este análisis se utilizó la amplificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA de pFM82139, la cual permitiría detectar secuencias homólogas a algunos de estos genes relacionados con la virulencia tales como *rck*, y *traT*. Su localización en el plásmido de *S. enteritidis* se muestra en las Figuras 3.12 y 3.14.

Se diseñaron en primer lugar una serie de oligonucleótidos basados en las secuencias ya publicadas de estos genes. Para cada gen se eligió una pareja de oligonucleótidos que comprendiera un fragmento de DNA lo suficientemente grande como para poder ser detectado sin dificultad en un gel de agarosa. Se estudió en cada caso la temperatura de desnaturalización más adecuada y la posible formación de bucles internos o apareamientos de cada oligonucleótido.

#### 3.3.5.1.- Detección del gen *rck*.

Se estudió en primer lugar el gen *rck* (*resistance complement killing*). Este gen, que como su nombre indica está implicado en la resistencia de *Salmonella* a la acción lítica del complemento, ha sido ampliamente estudiado en el serotipo Typhimurium y detectado por Heffernan *et al.* (1992a) mediante hibridaciones por la técnica de Southern en los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* y *S. dublin*. No obstante, estos autores no han detallado el lugar que dicho gen ocupa en el plásmido de virulencia objeto de nuestro estudio, por lo que pareció oportuna su localización.

Tomando como punto de partida la secuencia ya publicada del gen *rck* de *S. typhimurium* (Heffernan *et al.*, 1992a) se diseñaron los siguientes oligonucleótidos, teniendo en cuenta las premisas en cuanto a características de los mismos, anteriormente citadas:

5'-CCTGAAATACCGCTATGAGG-3'

5'-GAACCGGTAACCGACACC-3'

Estos cebadores, tanto al utilizar como molde DNA de pFM82139 linearizado con *Xba*I, como DNA del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* JR501, pFM501, linearizado también con *Xba*I (control positivo) permitieron amplificar un fragmento de DNA cuyo tamaño, de 400 pb, era acorde con el deducido al estudiar la secuencia publicada de *rck* (Figura 3.15). El hecho de linearizar el DNA que va a actuar como molde facilita la reacción de polimerización en cadena. Para comprobar en qué lugar de pFM82139 se encontraba localizada esa región homóloga a *rck* se

llevó a cabo una hibridación DNA-DNA. Se preparó una sonda constituida por el fragmento de 400 pb amplificado a partir de pFM501 empleando los oligonucleótidos anteriormente reseñados. El utilizar como molde DNA de pFM501 para la obtención de la sonda, en lugar de DNA de pFM82139, aseguraba que ésta se hallaba constituida única y exclusivamente por el gen *rck*. Dicha sonda se enfrentó a los distintos clones pMJ digeridos con *HindIII*. Se comprobó que hibridaba con el fragmento *HindIII* correspondiente a pMJ003 además de con el fragmento *HindIII* homólogo del plásmido pFM501 de *S. typhimurium*, lo cual corroboraba la localización del gen *rck* en este último plásmido descrita por otros autores. Para delimitar aún más la zona de dicho fragmento en que se encontraba *rck* se digirió el clon pMJ003 con las enzimas de restricción *BamHI* y *SmaI*, que dividían el clon en cinco fracciones claramente distinguibles, y se enfrentó a la misma sonda del experimento anterior. Se observó la hibridación de dicha sonda con un fragmento *BamHI/SmaI* de 2,1 kb (Figura 3.16) lo que sirvió para situarlo en el mapa de pFM82139 de una forma más precisa (Buisán *et al.*, 1994).

### 3.3.5.2.- Detección del gen *traT*.

El siguiente gen objeto de estudio fue el gen *traT*. Este gen que forma parte del operón de transferencia de los plásmidos del tipo F y que codifica para una lipoproteína, solamente ha sido localizado en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Sukupolvi *et al.*, 1990) y parece ser que le confiere cierta resistencia al suero.

Para detectar *traT*, cuya secuencia también había sido publicada en *S. typhimurium* por Sukupolvi *et al.* (1990) se emplearon los oligonucleótidos:

5'-GGGTGTGGTCCGATGAGC-3'

5'-GGCATTTCGATACCACACG-3'

De la misma manera que en el caso anterior se utilizó como DNA molde tanto DNA de pFM82139 como DNA de pFM501 (como control positivo) ambos linearizados con *XbaI*. No se pudo detectar amplificación utilizando los oligonucleótidos correspondientes a *traT* en el caso de pFM82139 aunque sí en el de pFM501. El tamaño de la banda amplificada en este último caso era acorde con el del fragmento de DNA de la secuencia de *traT* publicada que abarcaban los dos oligonucleótidos diseñados (Figura 3.15).

Para descartar totalmente la presencia de *traT* en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, se realizó un experimento de hibridación empleando como sonda el fragmento amplificado a partir del DNA de pFM501 con estos oligonucleótidos, de 590 pb, y enfrentándolo tanto a los clones pMJ digeridos con *HindIII* como al plásmido pFM82139 digerido con la misma enzima. No se detectó

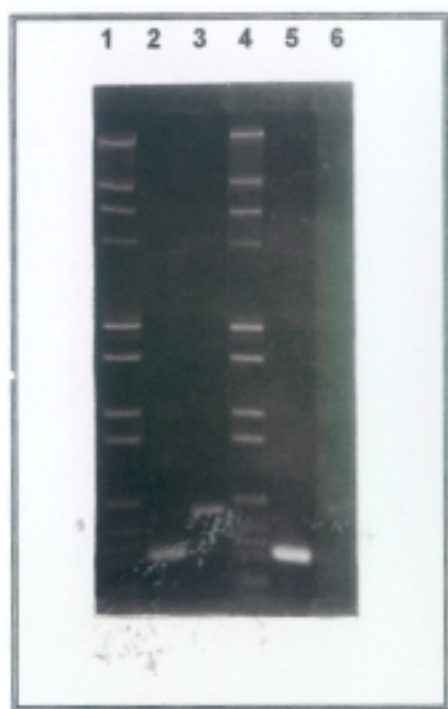


Figura 3.15

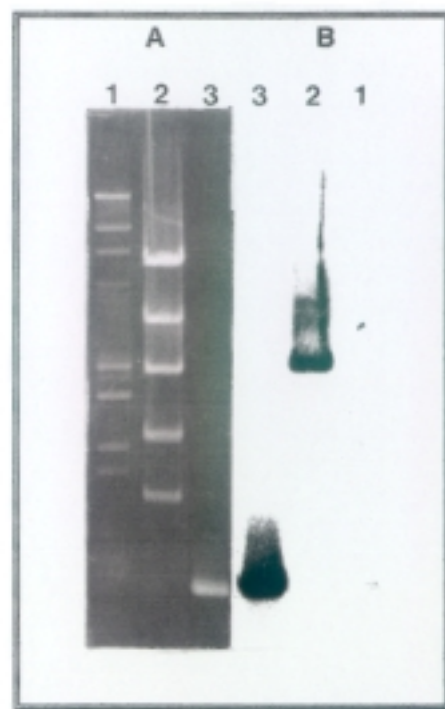


Figura 3.16

**Figura 3.15.-** Electroforesis en gel de agarosa del 1% de los productos de amplificación por PCR de pFM501 (carriles 2 y 3) y de pFM82139 (carriles 5 y 6) empleando cebadores correspondientes a *rck* (carriles 2 y 5) y *traT* (carriles 3 y 6). Los carriles 1 y 4 contienen los patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales).

**Figura 3.16.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa del 1 % de (1) patrones comerciales de pesos moleculares II y VI (ver Materiales), (2) pMJ003 digerido con *Bam*HI-*Sma*I y (3) producto de la amplificación por PCR de pFM501 utilizando cebadores correspondientes a *rck*. (B) Hibridación del DNA empleando como sonda el fragmento que aparece en el carril 3 (sonda *rck*).

hibridación en ninguno de los casos (Buisán *et al.*, 1994). Por otra parte se verificó que la sonda utilizada correspondía a la secuencia seleccionada del gen *traT* puesto que se comprobó la hibridación de dicha sonda con la banda mayor *HindIII*, de aproximadamente 35 kb de pFM501, lugar en que otros autores sitúan dicho gen.

### **3.4.- Caracterización de las regiones de pFM82139 no estudiadas en otros plásmidos de virulencia.**

De los resultados anteriormente expuestos se desprende que un porcentaje elevado del tamaño total de los plásmidos de virulencia permanece prácticamente sin estudiar. No obstante, estas regiones, pueden ser importantes tanto para el hallazgo de nuevos factores que de alguna manera afecten a la patogenicidad de *Salmonella*, como para poder dar explicación a la genealogía de los mismos. Teniendo en cuenta estas premisas se procedió a profundizar en el estudio de los clones pMJ006, pMJ002B y pMJ001.

#### **3.4.1.- Detección de posibles promotores.**

Simultáneamente a la elaboración del mapa génico de ciertas regiones del plásmido pFM82139, que no mostraron homología en bancos de secuencias, se procedió a realizar fusiones génicas con el gen *lacZ* empleando los plásmidos YEp (ver Materiales) con el objeto de detectar actividad promotora que pudiera servir de base a futuros experimentos dirigidos a la localización de nuevos ORFs y proteínas. Tras clonar en los plásmidos YEp, en los tres marcos de lectura y en las tres orientaciones posibles, el fragmento *XbaI/SalI* de 800 pb procedente del clon pMJ001 y el *EcoRI/HindIII* de 1,3 kb procedente del clon pMJ002B, se obtuvo una fusión positiva en ambos experimentos (observación de actividad  $\beta$ -galactosidasa mediante detección colorimétrica en placa), en el primer caso con el vector YEp358 (dirección de transcripción *XbaI*→*SalI*) y en el segundo con YEp357 (dirección de transcripción *EcoRI*→*HindIII*). Estos resultados indican la existencia de actividad promotora que puede, según el caso, dirigir la transcripción de potenciales marcos abiertos de lectura.

#### **3.4.2.- Detección en pFM82139 de un ORF homólogo a una endonucleasa codificada por el plásmido pKM101.**

Al realizar el mapa génico del plásmido se descubrió una región en el clon pMJ002B situada en el extremo *HindIII* colindante con pMJ003 que presentó una ligera homología en DNA con la endonucleasa *nuc* del plásmido conjugativo pKM101, cuya función se desconoce, aunque se postula que pudiera haber estado relacionada con procesos de conjugación por estar situada entre

dos agrupaciones de genes de transferencia (Pohlman *et al.*, 1993). Este plásmido presenta un tamaño de 35,4 kb.

Se decidió comprobar si en el plásmido de virulencia se encontraba presente de forma íntegra el ORF homólogo a *nuc*, de detectar su posible expresión y obtener la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida.

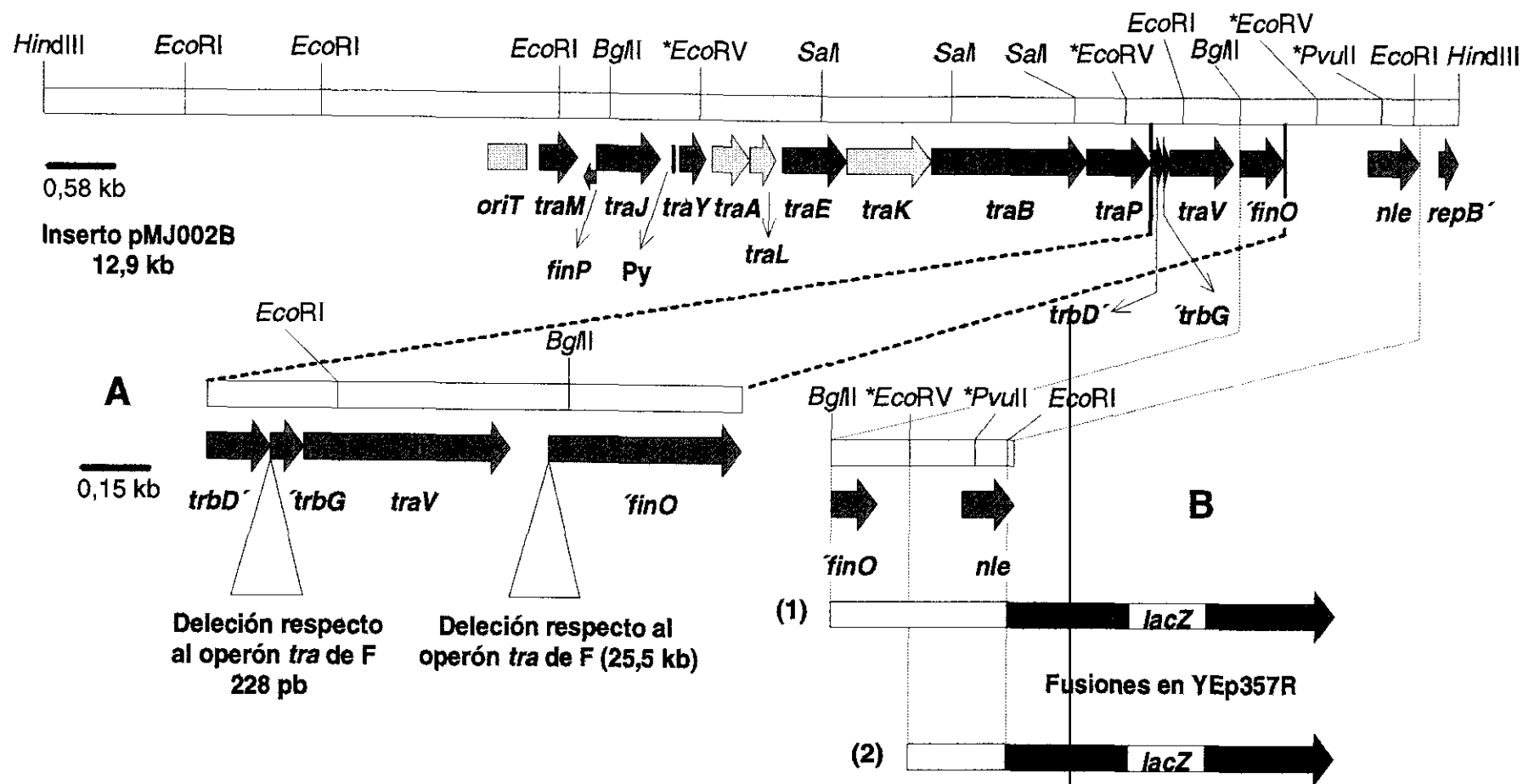
Para obtener la secuencia de nucleótidos de una sola cadena se emplearon los subclones *HindIII/EcoRI* (400 pb), denominado pHE (3,4 kb), y *EcoRI/BglII* (1,5 kb), denominado pEBG (4,5 kb), procedentes de pMJ002B. Debido al excesivo tamaño del segundo subclon se hizo necesario reducirlo empleando el punto de corte para la endonucleasa *EcoRV* situado a 853 pb del extremo *EcoRI*. Se procedió a la clonación del fragmento *EcoRI/EcoRV* (853 pb) tras su ligación con el vector pBluescript SK dando lugar al plásmido pEEV (3,85 kb). Este último plásmido aún presentaba un tamaño de inserto que no permitía, empleando los iniciadores comerciales, el cruce en la lectura de nucleótidos comenzada desde los dos extremos del sitio de clonación múltiple del vector. Por tanto, se dividió pEEV en dos nuevos clones, empleando un punto de corte intermedio *PvuII* situado a 311 pb del extremo *EcoRI*. Por un lado se clonó el fragmento de 311 pb (*EcoRI/PvuII*) en el vector digerido con *EcoRI/EcoRV*, y el *EcoRV/PvuII* de 542 pb en el vector digerido con *EcoRV*. Tras realizar la secuenciación de estos dos últimos plásmidos junto con pHE utilizando los iniciadores comerciales y después de la fusión de las distintas secuencias (con el adecuado tratamiento informático), la secuencia resultante fue de 1018 pb, incluyendo el ORF homólogo a *nuc* (534 pb) que estaba compuesto por 480 pb y se denominó *nle*. En la Figura 3.17 se muestra el alineamiento de la secuencia íntegra obtenida de pFM82139 y la publicada por Pohlman *et al.* (1993) donde se incluye la región 3' del gen *traG* y la totalidad de *nuc*. La identidad global entre ambas secuencias es de un 40,2%, pero en la zona codificante de la endonucleasa la homología es superior (50,7%). En la región que integra a *nuc* los autores anteriormente citados no encontraron secuencias consenso con promotores de *E. coli*, y de igual forma ha sucedido con *nle*. En la Figura 3.18 se representa también el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia nucleotídica de *nuc* (177 aa) y de *nle* (159 aa), observándose una identidad del 36,5%.

*Nuc* presenta una localización periplásmica; en su secuencia de aminoácidos se detecta una región inicial altamente hidrofóbica de 22 aa (péptido señal responsable de la localización) que presenta una homología muy baja con la presente en la secuencia deducida de aminoácidos de *nle* (que además presenta en esta región 4 aa más; Figura 3.18), aunque esta última sigue mostrando un carácter hidrofóbico según se desprende del análisis de su perfil de hidrofobicidad. Se ha observado la ruptura prematura del marco de lectura de *nle* respecto a *nuc* (Figuras 3.17 y 3.18). La ruptura del marco, basándonos en el punto de la secuencia de aa deducida de *nle* donde esta diverge completamente de la correspondiente a *Nuc*, hipotéticamente puede deberse bien a una delección puntual o a una inserción de dos nucleótidos sufrida en el extremo 3' de *nle* (Figura









**Figura 3.19.-** Representación de las secuencias homólogas detectadas mediante secuenciación parcial de subclones procedentes de la construcción pMJ002B. En aras de una mayor claridad se indican las secuencias detectadas como si de genes completos se tratase. Las enzimas de restricción de las cuales no se han estudiado todos sus puntos de corte aparecen señaladas con un asterisco. Los genes que se sitúan en regiones que no se han secuenciado presentan un relleno claro. A- Ampliación de la zona donde se observan deleciones en la secuencia con respecto a la región *tra* del plásmido F, localizándose las mismas. B- representación de las fusiones con *lacZ* realizadas con *nle*.

### 3.4.3.- Estudio de la región *tra*.

La región *tra* recibe este nombre por haberse localizado en ella genes homólogos a los del operón de transferencia de plásmidos conjugativos de tipo F. Hasta el momento solamente se ha descrito la secuencia de *traT* en *S. typhimurium* (Sukupolvi *et al.*, 1990), y la existencia de un origen de transferencia en la mayoría de los serotipos más importantes (Ou *et al.*, 1994). No obstante, esta zona es la menos caracterizada de los plásmidos de virulencia a pesar de poder aportar información valiosa en cuanto a la genealogía de los mismos. Como se indicó en el apartado 3.3.5.2. de Resultados, el gen *traT* está ausente en el plásmido de *S. enteritidis*. Este dato, sumado al hecho de la elevada homología existente entre el plásmido de *S. enteritidis* y el de *S. typhimurium*, alentaba la posibilidad de que en esta zona estuviese situado el fragmento divergente en aproximadamente 22 kb entre ambos plásmidos como se describió en el apartado 3.2 de Resultados. Todos estos antecedentes sirvieron para plantearse un estudio exhaustivo de la zona *tra* de pFM82139.

#### 3.4.3.1.- Secuenciación parcial de subclones de pMJ002B.

Para poder estudiar la zona *tra* de pFM82139 se hizo necesario proceder a la obtención de subclones de la construcción pMJ002B (por datos del mapa génico se sabía que contenía íntegramente la región *tra*). Para la construcción de los subclones se empleó el vector pBluescript SK. Los subclones obtenidos ya han sido citados en el punto de la explicación del mapa génico. Para obtener de una forma completa la secuencia en una cadena de DNA del fragmento *EcoRI/SalI* de 0,96 kb fue necesario dividirlo en dos clones empleando un punto de corte interno *EcoRV* situado a 436 pb del extremo *SalI*; por tanto, se procedió a la clonación en el vector anteriormente citado de un fragmento *SalI/EcoRV* de 436 pb y otro *EcoRI/EcoRV* de 528 pb. En definitiva se obtuvo la secuencia completa en una cadena del fragmento *BglII/EcoRI* de 473 pb y un total de 1837 pb que contienen el extremo *BglII* (310 pb) del fragmento *EcoRI/BglII* de 1,5 kb, y los fragmentos *BglII/EcoRI* (563 pb) y *EcoRI/SalI* (964 pb); y de manera incompleta los extremos del fragmento *EcoRV/BglII* (850 pb) y el extremo *BglII* del fragmento *SalI/BglII* (1,9 kb). Las secuencias obtenidas (a través de su comparación en bancos de secuencias) presentaron homología con genes pertenecientes al operón de transferencia de plásmidos conjugativos tipo F, presentando una homología global de un 70-80% salvo casos excepcionales, como en las zonas próximas al punto donde se detectó una posible delección (que se comentará más adelante), donde la homología encontrada es ligeramente inferior (ver homologías en el apartado correspondiente al mapa génico). Un mapa detallado de la zona indicando puntos de restricción y las secuencias homólogas a genes *tra* localizadas se representan en la Figura 3.19, y un esquema de los genes *tra* presentes en el plásmido F se encuentra en el apartado de Introducción. Se ha podido acotar la región *tra* del plásmido, que en principio estaba incompleta comparada con la única totalmente

secuenciada y caracterizada del plásmido F, y que abarca aproximadamente 7,4 kb. En todo caso, dentro de los operones de transferencia de los plásmidos del complejo IncF se han realizado subdivisiones según variantes de ciertas regiones y genes del operón, como son el origen de transferencia (*oriT*) y los genes *traM*, *traJ* y *traY*. De esta forma, estudiando específicamente estos genes, se puede conocer de una manera aproximada el origen de una región *tra* en estudio. En nuestro caso los genes *traM* y *traY* presentes en pFM82139 presentaron la mayor homología con la variante correspondiente a los plásmidos R1-19 y pColB4-K98, ambos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncFII, y en menor medida con otras variantes de otros plásmidos IncF. Igualmente se detectó homología con *traJ* de R1-19 (en pColB4-K98 no ha sido secuenciado). Sin embargo, otros genes *tra* localizados en pFM82139 lo han sido mediante homología con genes del plásmido F, probablemente por la ausencia de secuencias disponibles de esos genes en otros plásmidos del complejo IncF. De esta manera la región *tra* presente en pFM82139 parece estar filogenéticamente más cercana a las de R1-19 o pColB4-K98 que a la de F.

#### **3.4.3.2.- Caracterización de las posibles deleciones sufridas por la región *tra* de pFM82139.**

Partiendo de la base de que el operón de transferencia del plásmido F de *E. coli* presenta 33,3 kb, que la teórica región del plásmido de *S. typhimurium* no puede alcanzar ese tamaño y que en el plásmido de *S. enteritidis*, incluyendo la demostrada ausencia de *traT*, esta región todavía presenta un tamaño inferior; parecía lógico que, de las dos zonas fundamentales de divergencia entre los plásmidos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (Buisán *et al.*, 1994; Montenegro *et al.*, 1991) (ver Figuras 3.12 y 3.14), la mayor, de aproximadamente 22 kb, estuviese situada dentro de la región *tra*. Del estudio pormenorizado de dicha región de pFM82139 se ha deducido el lugar donde radica la variación.

Después de la comparación de las secuencias obtenidas en bancos de datos internacionales se identificaron dos posibles puntos de ruptura de diferente importancia en la secuencia de la región *tra* de pFM82139, tomando como referencia la del plásmido F, que podrían explicar la diferencia en tamaño de esta región entre los plásmidos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. La variación menor estaba localizada entre los puntos *SalI* y *EcoRI* (964 pb), concretamente en el extremo *EcoRI*, observándose una deleción en la secuencia de pFM82139 de aproximadamente 228 pb frente a la descrita del plásmido F. La teórica deleción ocuparía desde el gen *trbD* (extremo 3') hasta la zona media de *trbG* (Figuras 3.19 y 3.20).

La segunda diferencia observada, la más importante por su tamaño, se sitúa en el extremo *BglII* del fragmento *EcoRI/BglII* de 563 pb. Se trata de una deleción con respecto a la región *tra* de

```

748
TRA-pFM82139 - TGTATCAGTAACTGFACTACAAAAATAAATACTCTCCGGTCTCCGGAATA
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
TRA-F - TGTTCAGTAACTGCGCCACAAGAAATCGTACTTCTGCACCCGGAGAAAT
      ^trbD (6314)
TRA-pFM82139 - TAATTTTTCAG---ATCCCGGA-----
      |  ||  ||  ||  |||||
TRA-F - TCGGTTCTGAGTCATGCGCGGACAATTTTAATATGACTGCTGTCGGGTGTG
                               6386
TRA-pFM82139 - -----
TRA-F - ATGAAGAATTCAGAAATATAAGGAACCCTTCGATGAATAAGCTGGTTTCT
                               Fin trbD      Inicio trbG
TRA-pFM82139 - -----
TRA-F - GATGGCAGCGTCAAAAAATAAAATTATCCGGTGTGTATGAGTCCGGAAT
TRA-pFM82139 - -----
TRA-F - AACACCTCCGTTATGTGAAGTCAGTGCACCAGAACCTGATGCGGGTGGGA
TRA-pFM82139 - -----
TRA-F - AACGCATTTGTGGCATAGTTTATAAAATCATCACGGAGTACGGTTTTTGA
                                               6613
TRA-pFM82139 - ATGCCTGGCGCAGGAAAACATGTGTTCCCTGTCTGAATTAATCAAAAAGC
      |  ||||  |  |  |||||  |||  |  ||  |  |
TRA-F - AATCCTGACATTTGTA AAAACCTGTACGGTACGGGATTTGAAGAAGGATTT
TRA-pFM82139 - TGCTGCGTGAGAATAAGAAAGGTCTAAATCATGAACCGGATTTTCATGCCT
      ||  ||  ||  |  ||  |  |  |||||  |  ||  ||  ||  |
TRA-F - TGTGAAGTCCGATGAGAAAGGTGAGGGACAATGAACAGACTTCTTTCTT
                               Fin trbG - Inicio traV
TRA-pFM82139 - GATCCCTTTCTGCGGCGTGCTTCTGCTGTCCGGATGCGCCGGA 960
      ||  |||  |  ||  |  |  ||  |  |||  ||  |||||
TRA-F - TATTCCTCTGCTGGGGACCTTATTACTTTACGGCTGTGCCGGA 6757

```

**Figura 3.20.-** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos pertenecientes al fragmento *EcoRI/SalI* (964 pb) representado en dirección *SalI*→*EcoRI* de pFM82139 desde la posición 747 a la 960, frente al fragmento (6314-6757) perteneciente al operón de transferencia del plásmido F (Frost *et al.*, 1994). Se indica en negrita la región teóricamente deletionada. Los nucleótidos en cursiva y con doble subrayado corresponden a la posición numérica marcada dentro de los fragmentos anteriormente citados. Debajo de la secuencia de F se indican los genes descritos, señalándose los codones de iniciación con una línea horizontal sobre su secuencia, y los de terminación subrayados.



### 3.4.3.3.- Estudio de la funcionalidad del promotor Py.

Se ha descrito que la transcripción de la mayoría de los genes *tra* del plásmido F se realiza en parte en forma de un único transcrito empleando como promotor el situado antes de *traY* (primer gen del operón de transferencia) y denominado Py. Teniendo eso en cuenta, se procedió a valorar la posible funcionalidad del teórico promotor Py presente en pFM82139 realizando una fusión génica de la región 5' de *traY* con el gen *lacZ*. Partiendo del conocimiento previo en pFM82139 de las secuencias colindantes a Py, pertenecientes a *traJ* y *traY*, se pudo situar de manera exacta el codon de iniciación de *traY* respecto al extremo *EcoRV* (concretamente 157 pb) del plásmido que contenía el inserto *BglII/EcoRV* de 850 pb citado en apartados anteriores. Para realizar la fusión se eligió el plásmido YEp357R que mantenía el marco de lectura adecuado, digerido con las endonucleasas de restricción *XbaI/SmaI* para clonar el fragmento de 850 pb *XbaI* (procedente del *polylinker* del vector de clonación)/*EcoRV* (Figura 3.19). La fusión resultó positiva detectándose actividad  $\beta$ -galactosidasa, lo que implica la funcionalidad de Py en pFM82139.

A continuación, y basándonos en los datos conocidos de secuencia, pareció interesante detectar la expresión de un gen *tra* situado a mayor distancia de Py mediante una fusión YEp. Se procedió a la clonación en los plásmidos YEp, en los tres marcos de lectura posibles (YEp356,7,8) digeridos con las endonucleasas *XbaI/SalI*, el inserto *XbaI* (procedente del *polylinker* del vector de clonación)/*SalI*, de 1,9 kb procedente del plásmido que contenía el inserto *BglII/SalI* (1,9 kb). La construcción resultante incluiría desde Py los genes *traY*, *traA*, *traL* y los primeros 270 nucleótidos pertenecientes a *traE* fusionados a *lacZ*. En ninguno de los marcos se obtuvo fusión con actividad  $\beta$ -galactosidasa detectable. Esta ausencia de actividad puede deberse a mutaciones que rompan el marco de lectura de *traE* o a una expresión baja en las condiciones normales de cultivo de la cepa de *E. coli* transformada con estas construcciones.

## 3.5.- Detección de regiones homólogas entre pFM82139 y el cromosoma de *Salmonella*.

### 3.5.1.- Caracterización y aislamiento de regiones homólogas con *Salmonella typhi*.

Es importante destacar que *Salmonella typhi*, importante patógeno para el hombre, carece de plásmido de virulencia conocido (Roudier *et al.*, 1990; Popoff *et al.*, 1984); sin embargo, los estudios que se han realizado para relacionar factores de virulencia plasmídicos de serotipos no tifoideos, con otros cromosómicos de *S. typhi*, con el fin de encontrar mecanismos de virulencia

comunes, no han sido concluyentes y en la mayoría de los casos incompletos. Por este motivo, se decidió proceder en primer lugar a la búsqueda de regiones homólogas entre pFM82139 y DNA genómico procedente de la cepa 5866 de *S. typhi* mediante ensayos de hibridación DNA-DNA.

### 3.5.1.1.- Hibridación de pFM82139 frente a DNA cromosómico de *S. typhi* 5866.

Inicialmente, y para descartar la presencia de algún tipo de plásmido que pudiese estar relacionado con el de virulencia de serotipos no tifoideos, se procedió tanto a la extracción de DNA plasmídico de la cepa *S. typhi* 5866 por el método de Kado y Liu (1981), como de DNA total por el descrito por Ausubel *et al.* (1993), no detectándose la presencia de plásmido alguno.

En los ensayos de hibridación se emplearon los insertos *HindIII* de las siete construcciones pMJ obtenidas anteriormente, realizándose un análisis restricción con diversas endonucleasas de restricción con el motivo de seleccionar, específicamente para cada construcción, aquella que diese lugar a una sucesión de fragmentos suficientemente pequeños (aproximadamente de un tamaño de 2 kb como máximo) para utilizarlos como sondas frente al DNA total de *S. typhi* 5866. La elección de un tamaño inferior a 2 kb fue tomada de una manera arbitraria, en lugar de emplear los insertos íntegros, para favorecer al máximo la detección de posibles regiones homólogas de pequeño tamaño, que de emplear los insertos en su totalidad (algunos de muy elevado tamaño) podrían pasar inadvertidos al no darse hibridación debido a la cantidad de secuencia no homóloga presente en la sonda. La endonucleasa seleccionada para tratar los insertos procedentes de pMJ001, 002A y pMJ003 fue *HaeIII*, en el caso de pMJ002B se hizo necesaria la combinación de las endonucleasas *HaeIII* y *HindII*, para pMJ004 la combinación *EcoRI/XhoI*, pMJ005 con *EcoRI/PstI* y finalmente, el inserto procedente de tratar a pMJ006 con *HindIII* no fue necesario someterlo a ninguna digestión adicional.

Para la obtención de las sondas plasmídicas, después de la digestión de las siete construcciones pMJ procedentes de pFM82139 con la endonucleasa *HindIII*, los respectivos insertos fueron eluidos y éstos a su vez tratados con las enzimas anteriormente citadas, exceptuando el procedente de pMJ006.

Para llevar a cabo los experimentos de hibridación no radiactiva mediante la técnica de Southern se realizaron ensayos independientes para cada sonda, utilizando las sondas preparadas de la manera anteriormente expuesta enfrentándolas a DNA genómico de *S. typhi* 5866 digerido previamente con la endonucleasa *HindIII*, empleando como control positivo en cada caso los insertos procedentes de los clones pMJ estudiados, y como negativo DNA del fago lambda digerido con *HindIII*. En los diversos experimentos se emplearon condiciones de hibridación de máximo rigor (68°C), seleccionando únicamente hibridaciones de alta homología; las condiciones exactas de experimentación se detallan en el apartado de Métodos. De los resultados obtenidos tras los oportunos revelados, que a partir de este momento se realizaron siguiendo la técnica quimioluminiscente, únicamente se advirtió la aparición de una banda de elevado tamaño (a nivel

de la de 23 kb del patrón) indicativa de homología con la sonda preparada a partir del inserto de la construcción pMJ003 como se observa en la Figura 3.22.

### 3.5.1.2.- Acotamiento de la región homóloga pMJ003-*S. typhi* 5866.

Toda vez que la banda cromosómica homóloga *HindIII* presentaba un tamaño muy elevado y la sonda procedente de pMJ003 abarcaba 10,3 kb, se planteó la necesidad de profundizar en la caracterización de las regiones homólogas observadas con la finalidad fundamental de conocer de manera aproximada la magnitud de las mismas.

Por tanto se procedió a realizar ensayos de hibridación empleando DNA de *S. typhi* digerido con diversas endonucleasas de restricción y combinaciones de las mismas enfrentándolo a dos sondas procedentes de pMJ003. Una de ellas incluía el fragmento *HindIII/SmaI* de 5,8 kb (el punto *HindIII* delimita los insertos de las construcciones pMJ003 y pMJ002A), y la otra el fragmento contiguo *SmaI/BamHI* de 2,1 kb, representando entre ambas un alto porcentaje del inserto estudiado. Para facilitar posteriores estudios ambos fragmentos se clonaron en pBluescript SK. Se pudo comprobar que de todas las enzimas con las que se trató el DNA de *S. typhi* (*HindIII*, *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI/SalI* y *BamHI/SmaI*), solamente aparecieron bandas claramente menores de 23 kb en los casos de las digestiones con *BamHI* (13 kb), donde ambas sondas hibridaron con la misma banda, y con *SmaI* y *BamHI/SmaI*, donde además los patrones de hibridación de las dos sondas empleadas fueron distintos. Así la sonda *SmaI/BamHI* de 2,1 kb hibridó con una banda de aproximadamente 6,2 kb en la restricción *SmaI* del DNA cromosómico y con una de alrededor de 5,5 kb en la restricción *BamHI/SmaI*. Este era un dato inequívoco de la presencia de un punto *BamHI* dentro de la banda *SmaI*. Sin embargo, la sonda *HindIII/SmaI* de 5,8 kb hibridó con las mismas bandas tanto en la restricción de DNA genómico *SmaI* como en la *BamHI/SmaI*. Estas bandas fueron de un tamaño próximo a 4,4 y 1 kb. Partiendo de la base de los resultados conseguidos se delimitó la región plasmídica homóloga; comprobándose como tanto una sonda conteniendo el extremo *HindIII/NheI* (3,4 kb) del fragmento *HindIII/SmaI* de 5,8 kb como la formada por un fragmento *KpnI* de 700 pb situado a 850 pb del extremo *SmaI* de la banda *SmaI/BamHI* de 2,1 kb, no hibridaron con DNA procedente de *S. typhi*, quedando por tanto la región que incluiría la zona homóloga reducida a 3,3 kb. Las hibridaciones más importantes se representan en las Figura 3.23.

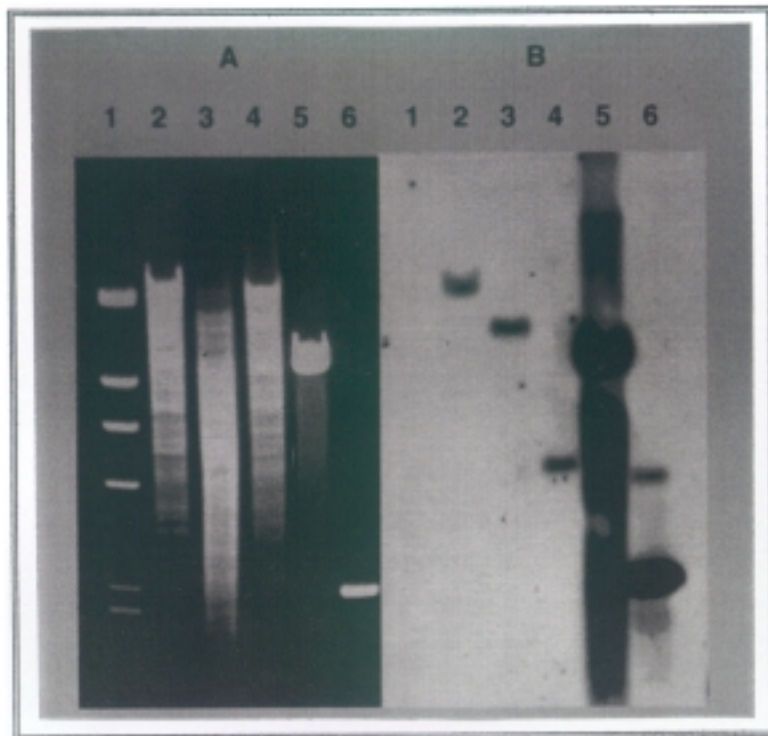
Este resultado, junto a los anteriormente descritos, aportó una información doble, ya que por un lado demostraba que posiblemente las dos bandas observadas correspondían a dos fragmentos *SmaI/SmaI* seguidos, y por otro lado parecía posible debido a la divergencia en las bandas que hibridaban con las dos sondas que el punto *SmaI* que delimita ambas estuviese conservado en la zona homóloga del cromosoma de *S. typhi* 5866.

### 3.5.1.3.- Clonación de la región homóloga presente en *S. typhi* 5866.

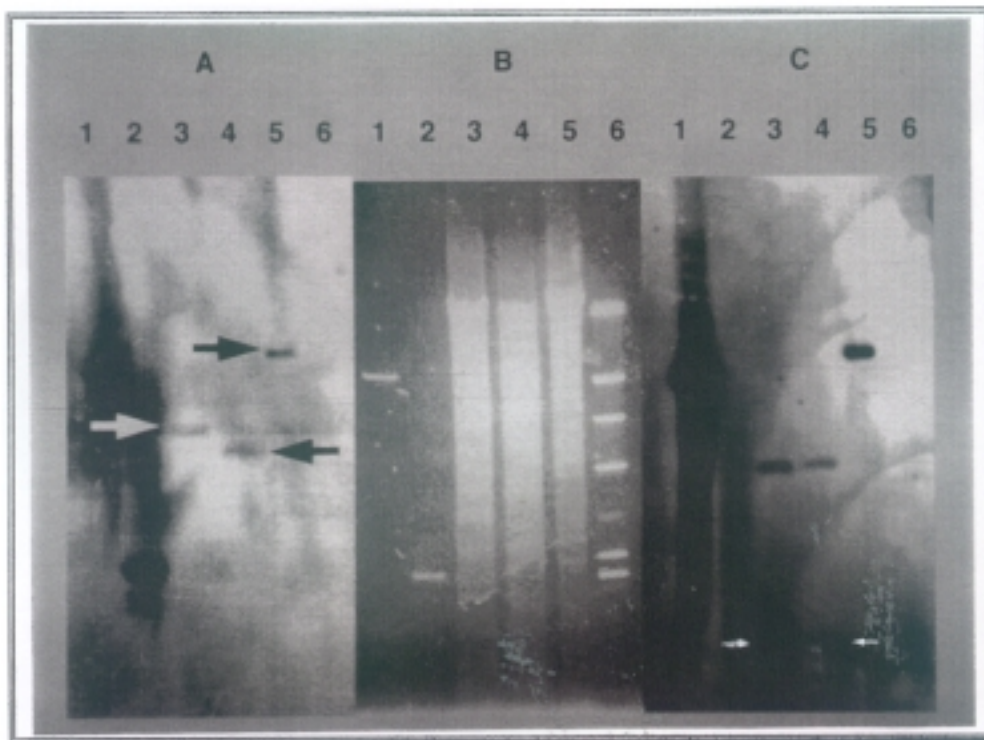
Una vez sabido que la región homóloga estudiada estaba incluida en una banda *Bam*HI de alrededor de 13 kb de tamaño, se planteó proceder a su clonación para estudiar en profundidad y de manera aislada la zona implicada. Para realizar la clonación del fragmento cromosómico se llevó a cabo la digestión de DNA total de *S. typhi* 5866 con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, y posteriormente se eluyó del gel el DNA de la zona comprendida entre 10-15 kb aproximadamente. Como vector de clonación se empleó el plásmido pBluescript SK digerido con la misma enzima que el DNA cromosómico, y en siguientes pasos defosfatizado y eluído. Cuando estuvieron preparados los distintos DNA se ligaron y transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los transformantes se seleccionaron en placas de LB-ampicilina. Se obtuvieron cerca de 500 transformantes con plásmidos portadores de inserto.

Para la detección de los posibles clones que contuviesen el fragmento de 13 kb buscado, se eligió la técnica de *colony blot* no radiactivo. En resumen, el proceso suponía en primer lugar la réplica de los 500 transformantes de forma ordenada a nuevas placas de LB-ampicilina, transfiriendo las colonias obtenidas a membranas de nylon donde a continuación sufrieron diversos tratamientos. Como controles se usaron *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el vector de clonación (negativo) y la construcción que presentaba clonado el fragmento *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) procedente de pMJ003 (positivo). La sonda que se empleó fue la citada en puntos anteriores, formada por el fragmento *Hind*III/*Sma*I de 5,8 kb marcada con digoxigenina de la manera convencional. Tras el proceso de revelado se advirtieron hibridaciones claras con los controles positivos y con uno de los transformantes estudiados, que suponía un teórico positivo en el que el plásmido presente fue denominado pST93.

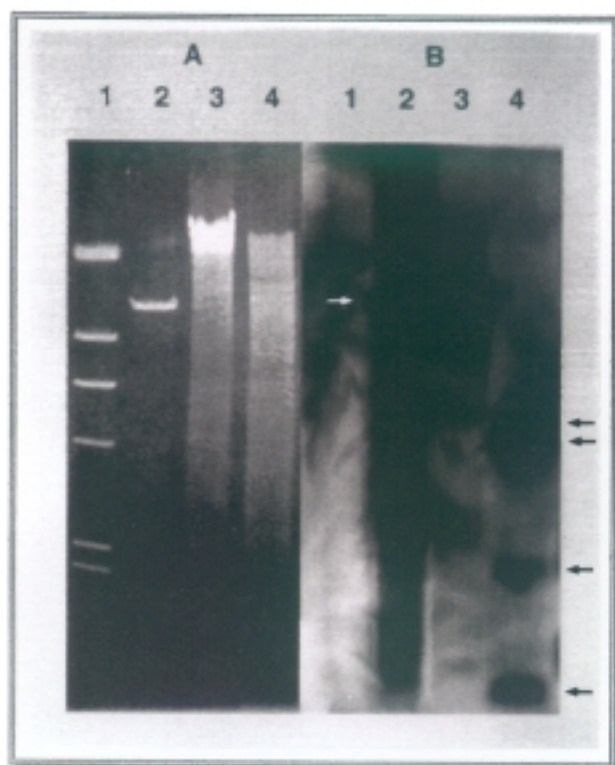
Después de la extracción de DNA de pST93, este fue digerido con *Bam*HI y *Bam*HI/*Sma*I. En el primer caso se detectaron en gel de agarosa dos bandas, una de 3 kb (correspondiente al vector) y un inserto de alrededor de 13 kb; mientras que con la segunda combinación de enzimas el patrón de restricción estaba formado por cinco bandas visibles que se aproximaban a lo esperado teniendo en cuenta los datos obtenidos anteriormente a partir de los estudios de hibridación. Para demostrar que el origen del inserto *Bam*HI de pST93 era el cromosoma de *S. typhi* se enfrentó una sonda marcada con digoxigenina compuesta por el inserto de pST93 a DNA total de *S. typhi* 5866 digerido tanto con la endonucleasa *Bam*HI como *Bam*HI/*Sma*I comprobándose la hibridación con todas las bandas observadas previamente (salvo la debida al vector) y por tanto la pertenencia del inserto clonado al cromosoma de *S. typhi* 5866 (Figura 3.24).



**Figura 3.22.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de DNA total de *S. typhi* 5866 digerido con *Hind*III (2), DNA total de *S. enteritidis* 386 digerido con *Eco*RI/*Sal*I (3) y *Hind*III (4), inserto *Hind*III de pMJ003 (5) y fragmento eluido *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb) de pMJ003 (6). En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Autorradiografía de la hibridación del DNA utilizando como sonda, marcada con digoxigenina, el fragmento *Hind*III de pMJ003 digerido con *Hae*III.



**Figura 3.23.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del fragmento eluido *Hind*III de pMJ003 (1), fragmento eluido *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb) de pMJ003 (2), DNA total de *S. typhi* 5866 digerido con *Sma*I (3), *Sma*I/*Bam*HI (4) y *Bam*HI (5). En el carril 6 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C) Autorradiografías de las hibridaciones del DNA utilizando como sondas los fragmentos, marcados con digoxigenina, *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb) y *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) de pMJ003 respectivamente.



**Figura 3.24.-** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del inserto *Bam*HI de pST93 (2), del DNA total procedente de *S. typhi* 5866 digerido con *Bam*HI (3) y *Bam*HI/*Sma*I (4). En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (B) Autorradiografía de la hibridación del DNA utilizando como sonda el fragmento *Bam*HI, marcado con digoxigenina, del plásmido pST93.



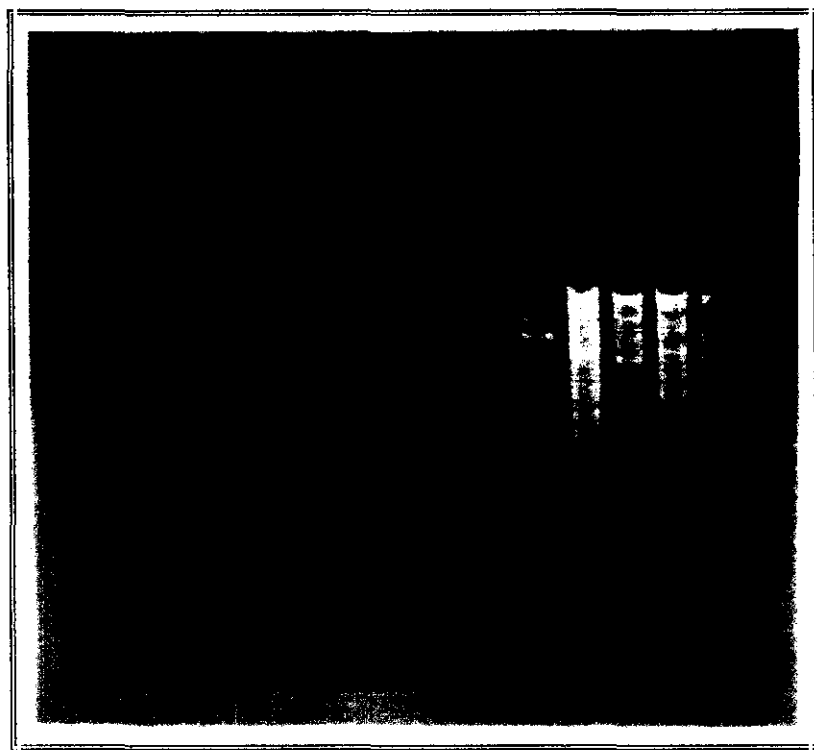
**Figura 3.25.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA digerido con *Bam*HI/*Sma*I de pST93 (2), de los fragmentos eluidos procedentes de pMJ003 *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb) (3), *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) (4) y el inserto *Hind*III (5). En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) y (C) Autorradiografías de las hibridaciones del DNA utilizando como sondas los fragmentos, marcados con digoxigenina, *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb) y *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) de pMJ003 respectivamente.

Por otro lado, para comprobar que bandas procedentes de la digestión *Bam*HI/*Sma*I del inserto de pST93 eran homólogas a las sondas normalmente empleadas se realizó un nuevo ensayo de hibridación empleando DNA de pST93 digerido con esa combinación de endonucleasas utilizando como sondas las *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) y *Sma*I/*Bam*HI (2,1 kb). Se pudo comprobar de esta manera la aparición con la sonda *Bam*HI/*Sma*I de 2,1 kb de una banda de 5,5 kb que sería la banda *Bam*HI/*Sma*I observada en experimentos anteriores, mientras que con la sonda *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) aparecieron dos bandas de 4,4 y 1 kb (que corresponderían a las *Sma*I/*Sma*I descritas en puntos anteriores). De esta forma la banda de 2,1 kb procedente de la restricción de pST93 (única del inserto que no hibridó con ninguna de las dos sondas) es por exclusión un fragmento *Sma*I/*Bam*HI que se encuentra situado a continuación de una de las dos *Sma*I/*Sma*I (Figura 3.25).

### **3.5.2.- Presencia de regiones homólogas a pFM82139 en el cromosoma de *S. enteritidis*.**

Al demostrarse la existencia de secuencias homólogas entre el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* 82139 y el cromosoma de *S. typhi* 5866, pareció interesante comprobar si *S. enteritidis* presentaba también en su cromosoma secuencias homólogas como las encontradas en *S. typhi*, lo que podría significar la presencia de ciertos genes duplicados en plásmido y cromosoma. Se realizó un experimento de hibridación DNA-DNA empleando como sonda el inserto del clon pMJ003 tratado con la enzima *Hae*III. El DNA al que se enfrentó esta sonda procedía de la cepa 366 de *S. enteritidis* caracterizada por carecer de plásmido de virulencia (Ibáñez y Rotger, 1993); así eliminábamos cualquier interferencia que pudiera estar causada por la presencia del mismo. El DNA extraído de la cepa de *S. enteritidis* 366 fue digerido con *Sal*I/*Eco*RI y *Hind*III. Se observó una hibridación clara en el primer caso con una banda de aproximadamente 16 kb y en el segundo con una de 5 kb (Figura 3.22). De igual forma, en una hibridación empleando como sonda el inserto de 5,8 kb *Hind*III/*Sma*I frente al DNA total de *S. enteritidis* 82139 portadora del plásmido de virulencia y al DNA plasmídico obtenido de esa misma cepa (pFM82139) ambos digeridos con *Hind*III, se detectó una banda común del tamaño del inserto de pMJ003, como era de esperar, y en el caso de la restricción correspondiente al DNA total apareció una banda adicional algo inferior a 5 kb, que lógicamente pertenece a una región cromosómica homóloga al plásmido de virulencia (Figura 3.26).

Estos resultados parecen indicar una posible conservación en *S. typhi* y *S. enteritidis* de regiones cromosómicas homólogas con el plásmido de virulencia pFM82139. Será necesario llevar a cabo un estudio de hibridación a gran escala con diversos serotipos de *Salmonella* para valorar exactamente la distribución de estas zonas homólogas.



**Figura 3.26.-** (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del fragmento eluido *Hind*III de pMJ003 (2), DNA de pFM82139 digerido con *Hind*III (3), DNA total de *S. enteritidis* 82139 digerido con *Hind*III (4 y 5), DNA total de *S. typhi* 5866 digerido con *Hind*III (6) y *Eco*RI (7). En el carril 1 patrón comercial de pesos moleculares II (ver Materiales). (A) Autorradiografía de la hibridación del DNA utilizando como sonda, marcada con digoxigenina, el fragmento *Hind*III/*Sma*I (5,8 kb) de pMJ003.

### 3.6.- Caracterización de la construcción pST93.

Teniendo en cuenta que el inserto presente en el plásmido pST93 presentaba un tamaño considerable (13 kb) y que la región homóloga detectada no abarcaba su totalidad, se hizo necesario proceder a un estudio detallado del clon para poder acotar exactamente las zonas homólogas al plásmido de virulencia.

#### 3.6.1.- Análisis restrictivo de pST93.

Se procedió a tratar DNA de pST93 con diversas endonucleasas de restricción con el objeto de conseguir su cartografiado, y de esta manera facilitar su uso en ensayos posteriores. De las diversas enzimas empleadas, *Xba*I, *Cla*I, *Kpn*I, *Apa*I, *Sma*I, *Hind*III y *Xho*I dieron lugar a un número bajo de fragmentos facilitando su colocación. Para la elaboración del mapa de restricción

dichas enzimas fueron utilizadas independientemente y en parejas. Los análisis electroforéticos de las muestras se realizaron empleando porcentajes de agarosa entre 0,7-2% para visualizar todas las posibles bandas generadas en las restricciones. Cuando fue necesario se emplearon combinaciones de las anteriormente citadas, junto a otras que presentaron puntos únicos de corte en el *polylinker* del vector, sin afectar al inserto. En ciertos casos donde una endonucleasa presentaba múltiples puntos de corte en el inserto de pST93, sólo algunos de ellos se localizaron exactamente (Figura 3.27).

### 3.6.2.- Subclonación de pST93.

A partir del cartografiado previo de pST93 se planificó la subclonación del inserto de pST93 en un número suficiente de clones que contuvieran la mayoría de la secuencia de pST93, para a continuación proceder a su secuenciación parcial y obtener información tanto de las regiones homólogas al plásmido de virulencia como de las no homólogas. Las nuevas construcciones se elaboraron a partir de los siguientes fragmentos (avanzando de izquierda a derecha teniendo en cuenta la representación de pST93 que se muestra en la Figura 3.27): *Bam*HI/*Hind*II 2,4 kb (pBH), *Hind*III/*Xho*I 1,6 kb (pHX), *Xba*I/*Sma*I 2 kb (pXBS), *Xho*I/*Sma*I 0,9 kb (pXHS), *Xho*I/*Eco*RV 1,5 kb (pXHE), *Xho*I/*Sma*I 2 kb (pXHSM), *Eco*RV/*Hind*II 1,4 kb (pEH), *Eco*RV/*Cla*I 3,1 kb (pEC) y *Cla*I/*Bam*HI 1,6 kb (pCB). El proceso de clonación fue similar al descrito en puntos anteriores salvo en el caso de la obtención del plásmido pXHSM, que se obtuvo realizando restricciones parciales con *Sma*I a partir de un subclón obtenido con antelación que presentaba como inserto la banda *Xho*I/*Cla*I de 5,6 kb.

### 3.6.3.- Secuenciación parcial de los clones procedentes de pST93.

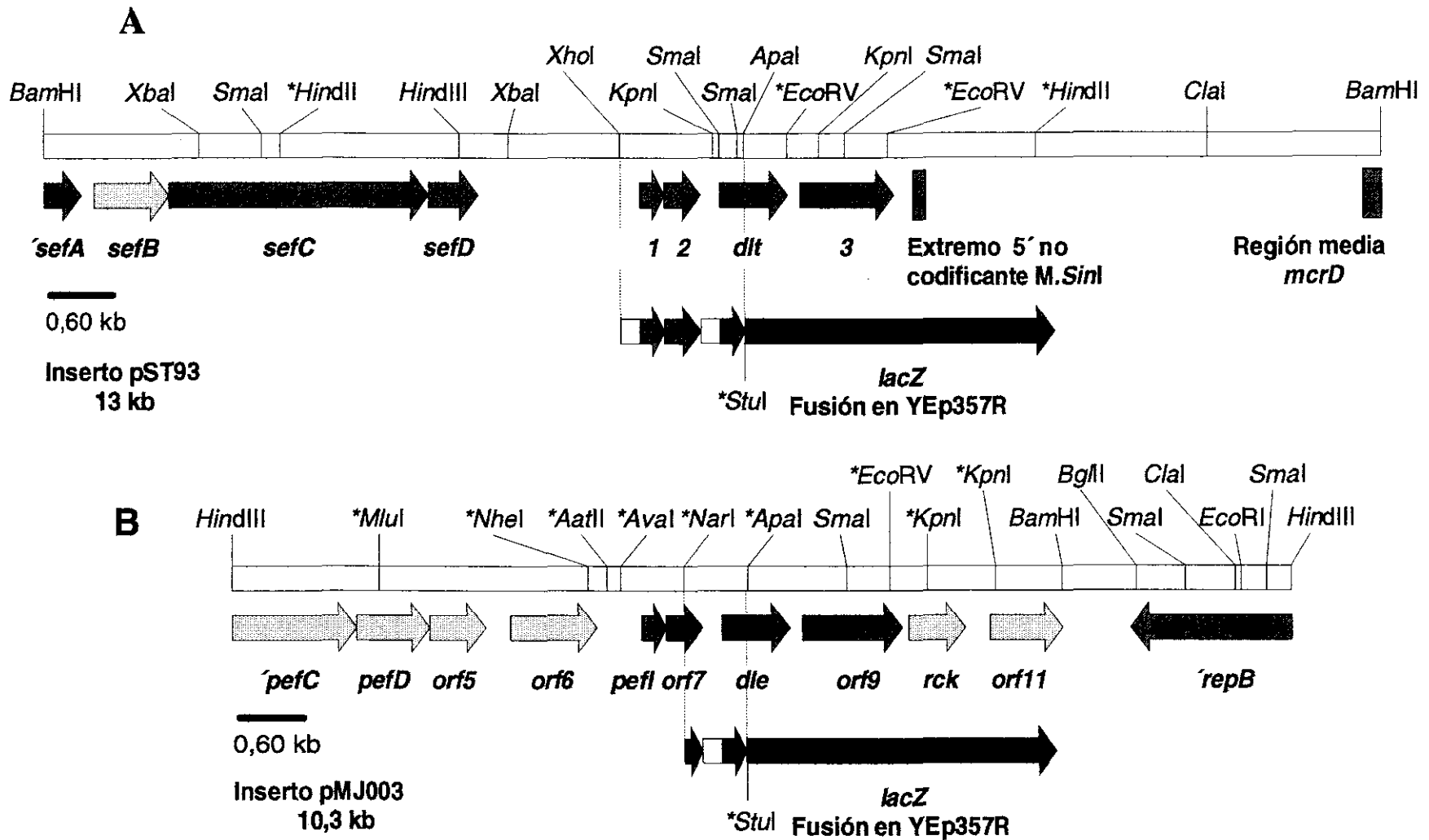
De todos los plásmidos construídos se llevó a cabo su secuenciación parcial mediante secuenciación automatizada como se indicó en el apartado de la elaboración del mapa génico. Las secuencias obtenidas después del adecuado tratamiento informático fueron enviadas para su comparación a bancos de secuencias internacionales. Los resultados obtenidos se indican en la tabla acompañante indicando A.- plásmido empleado, B.-extremo y número de nucleótidos secuenciados en cada caso, C.- porcentaje de homología con secuencia depositada en banco de secuencias y D.- secuencia homóloga, si la hubiere, junto con las aclaraciones oportunas. En la Figura 3.27 se representan sobre pST93 las secuencias homólogas detectadas.

A.- SUBCLÓN	B.- SECUENCIADO	C.- %	D.- HOMOLOGÍA CON
pBH 5,4 kb	<i>Bam</i> HI (300 pb)	96	<i>sefA</i> (498 pb) componente del sistema de síntesis de fimbrias SEF14 de <i>S. enteritidis</i> (Clouthier <i>et al.</i> , 1993).
	<i>Hind</i> II (156 pb)	97	<i>sefC</i> (2445 pb) componente del sistema de síntesis de fimbrias SEF14 de <i>S. enteritidis</i> (Clouthier <i>et al.</i> , 1993).
pHX 4,6 kb	<i>Hind</i> III (174 pb)	97	<i>sefD</i> (450 pb) subunidad de fimbrias SEF18 de <i>S. enteritidis</i> (Clouthier <i>et al.</i> , 1994).
	<i>Xho</i> I (355 pb)	--	Sin homología representativa
pXBS 5 kb	<i>Xba</i> I (298 pb)	--	Sin homología representativa
pXHS 3,9 kb	<i>Xho</i> I (319 pb)	70	Esta homología se localiza en las 289 pb más alejadas del punto <i>Xho</i> I con <i>pefI</i> (213 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993). La homología desaparece totalmente en el extremo <i>Xho</i> I.
	<i>Sma</i> I (472 pb)	88	Región 3' de <i>orf7</i> (351 pb) y zona promotora de <i>orf8</i> (654 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
pXHE 4,5 kb	<i>Eco</i> RV (345 pb)	97	<i>orf8</i> (654 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993)
pXHSM 5 kb	<i>Sma</i> I (388 pb)	98	<i>orf9</i> (900 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
pEH 4,4 kb	<i>Eco</i> RV (409 pb)		Comenzando desde el extremo <i>Eco</i> RV:
	116 pb	96	<i>orf9</i> (900 pb) del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
	77 pb	--	Sin homología representativa
	85 pb	92	Región intergénica (267 pb) entre <i>rck</i> y <i>orf11</i> del plásmido de virulencia de <i>S. typhimurium</i> (Friedrich <i>et al.</i> , 1993).
	131 pb	89	Zona inmediatamente anterior a la región promotora del sistema de restricción-modificación <i>SinI</i> de <i>Salmonella infantis</i> (Karreman y Waard, 1988).
	<i>Hind</i> II (200 pb)	--	Sin homología representativa
pEC 5,1 kb	<i>Cla</i> I (199 pb)	--	Sin homología representativa

pCB 4,6 kb	<i>Cla</i> I (346 pb) <i>Bam</i> HI (270 pb)	-- 77	Sin homología representativa Las 200 primeras pb desde el extremo <i>Bam</i> HI presentan la homología citada con el gen <i>mcrD</i> (relacionado con el sistema de restricción <i>mcrBC</i> de <i>E. coli</i> ) (Burland <i>et al.</i> , 1995).
------------	---	----------	---

Como aclaración y resumen de lo expuesto en la tabla anterior es importante destacar la acotación exacta de las secuencias homólogas a genes presentes en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* 82139 y en el cromosoma de *S. typhi* 5866, siendo estos *pefI* (cuyo producto presenta homología con proteínas reguladoras de operones de síntesis de fimbrias), *orf7* (que no ha sido relacionado con biogénesis de fimbrias, pero su producto es homólogo a diferentes tipos de proteínas reguladoras), *orf8* (de función desconocida) y *orf9* (de función desconocida) (Friedrich *et al.*, 1993). En total la zona descrita presenta un tamaño aproximado de 2,6 kb.

De las homologías descritas cabe destacar por su novedad la encontrada fuera de la región homóloga plásmido de virulencia/cromosoma con el gen *mcrD* de *E. coli*, aunque por datos de secuencia este se encuentre interrumpido en *S. typhi* al desaparecer de forma súbita la homología detectada con dicho gen. También es importante destacar la primera constatación en forma de secuencia de la presencia de genes de sistemas de fimbrias del tipo SEF14 y SEF18 en *S. typhi*. Por otro lado, se comprobó la discrepancia existente entre los autores que llevan a cabo la secuenciación del *orf8*, los cuales indicaban la ausencia de secuencias homólogas depositadas en banco de secuencias, tanto en DNA como de la correspondiente proteína deducida (Friedrich *et al.*, 1993) y los datos publicados en la última revisión del mapa génico de *S. typhimurium* donde a la proteína deducida de *orf8* se le asignaba homología con DsbA de *E. coli* (Sanderson *et al.*, 1995). Por todo ello, pareció oportuno enviar las secuencias correspondientes al E.M.B.L. para ser comparadas mediante los programas FASTA (DNA) y BLITZ (proteína) para corroborar que resultado era el cierto. De esta forma se confirmó que el teórico producto de la secuencia correspondiente a *orf8* mostraba regiones conservadas con proteínas del tipo DsbA de *E. coli*, que presentan una actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro en periplasma, importante para que las proteínas de exportación adquieran una estructura espacial adecuada y por tanto sean totalmente activas. Debido a que el gen que codifica esta proteína no ha sido descrito hasta el momento y por su posible participación en la patogénesis de *Salmonella*, pareció interesante iniciar su caracterización, teniendo en cuenta además su posible presencia, en ciertos serotipos de *Salmonella*, tanto en cromosoma como en el plásmido de virulencia.



**Figura 3.27.-** A- localización de las secuencias homólogas detectadas mediante secuenciación parcial de subclones procedentes del clon pST93 de *S. typhi*. Se representan como 1-secuencia homóloga a *pefI*, 2- secuencia homóloga al *orf7* y 3- secuencia homóloga al *orf9*, los tres descritos en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (ver texto). En la parte inferior de la figura se representa la fusión de *dlt* con *lacZ*. B- representación de los genes situados en pMJ003 mediante secuenciación parcial. En la parte inferior de la figura se representa la fusión de *dle* con *lacZ*. En todos los casos las enzimas de restricción de las cuales no se han estudiado todos sus puntos de corte aparecen señaladas con un asterisco. Los genes que se sitúan en regiones de las que no se dispone de secuencias presentan un relleno claro.

### 3.6.4.- Secuenciación y estudio comparativo de los ORFs de *Salmonella* relacionados con *dsbA* de *E. coli*.

Una vez obtenido el mapa de restricción de pST93 y tras el proceso de secuenciación parcial de los subclones procedentes del mismo, se supo que el ORF homólogo al *orf8* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* se encontraba localizado de manera íntegra dentro del plásmido pXHSM, de 5 kb. En el caso del plásmido de *S. enteritidis* 82139, basándonos en la extensa homología presente en esta región con el plásmido de *S. typhimurium*, conservación de ciertos puntos de corte para enzimas de restricción y datos de secuencia procedente de subclones empleados en la elaboración del mapa génico, se pudo deducir que el ORF buscado estaba situado dentro del subclón que portaba el inserto *NarI/SmaI* de 1,5 kb (pNS). Por tanto, estos dos subclones fueron elegidos para proceder a la secuenciación de las dos cadenas de DNA de los homólogos de *orf8* que en el caso del cromosoma de *S. typhi* 5866 se denominó *dlt* (*disulfide-bond-formation like typhi*) y el presente en pFM82139 *dle* (*disulfide-bond-formation like enteritidis*)

Para realizar la secuenciación en doble cadena se emplearon oligonucleótidos diseñados tomando como referencia la secuencia publicada de *orf8* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Se emplearon los mismos iniciadores tanto en la secuenciación a partir de pNS como de pXHSM. En total fueron necesarios cuatro oligonucleótidos para cada cadena de DNA, obteniendo de esta manera secuencias solapantes que abarcaron la totalidad de los ORFs, así como la regiones promotora y terminadora. En definitiva, se obtuvieron en doble cadena, 926 pb en el caso de *S. typhi* y 928 pb en el de pFM82139. Dichas secuencias fueron enviadas para su inclusión en las bases de secuencias de la E.M.B.L., siéndoles asignado los números de acceso X94325 (*dlt*) y X94326 (*dle*). El ORF denominado *dlt* está compuesto de 654 pb mientras que el de *dle* de 657 pb. Además fueron enviadas para su comparación en los bancos del E.M.B.L. empleando el programa FASTA obteniéndose, en adición a las homologías obtenidas entre ellas y con la secuencia que incluye al *orf8* de *S. typhimurium* indicadas en la Figura 3.28, una homología de aproximadamente un 50% con *dsbA* de *Erwinia chrysanthemi* (secuencia no publicada). De igual forma las secuencias de aminoácidos deducidas de *dlt* (Dlt 217 aa) y *dle* (Dle 218 aa) se compararon entre sí y con la deducida del *orf8* del plásmido de *S. typhimurium* determinándose unos porcentajes de identidad próximos a un 90%. Así mismo se detectaron seis secuencias homólogas, pertenecientes a proteínas tipo DsbA depositadas en los bancos del E.M.B.L., observándose la existencia de distintos grados de homología con las mismas, concretamente estas fueron DsbA de *E. coli*, Por de *Haemophilus influenzae*, TcpG de *Vibrio Cholerae*, DsbA de *E. chrysanthemi*, DsbA de *Shigella flexneri* y DsbA de *Legionella pneumophila*. Todos los porcentajes de identidad encontrados entre las distintas secuencias aparecen reflejados en la

		-35	
<i>S. typhi</i>	ATTC <b>TGGAAA</b> ACTCATGACCGGAATATTC <b>CGGCTGCCGGCTTAATGACCG</b>		50
<i>S. typhimurium</i>	ATTC <b>TGGAAA</b> ACGCATAACCGGAATATTC <b>CGACTGCCGCCTTAATGACCA</b>		50
pFM82139	ATTC <b>TGGAAA</b> ATTCATGACCGGAATATTC <b>CGGCTGCCGCCTTAATGACCA</b>		50
	*****.***.*****.*****.*****.*****.*****.		
		-10	
<i>S. typhi</i>	TGCCGGATGAATTAAGATTTACTGCTGCTGTCAGGCGGTACCGTTAAGCG		100
<i>S. typhimurium</i>	TACCTGATGAATTAATATTTACTGCTGCTGTCAGGCGGTGCCGTTAAGCG		100
pFM82139	TGCCGGATGAATTAATATTTACTGTTGCTGTCAGGTGGTGTGTTAATCG		100
	*.***.*****.*****.*****.*****.*****.***		
		S/D	
<i>S. typhi</i>	GCCTTTCATTCCTGTATATCTGTTATCCATGGAGTGTTC <b>CGTGACGATGA</b>		150
<i>S. typhimurium</i>	GCCTTTCGTTCTGTATATCTGTTATCCATGGAGTGTTC <b>CGTGACGATGA</b>		150
pFM82139	GT-TTTTGTTCCTGTATATCTGTTATCCATGGAGTGTTC <b>CGTGACGATGA</b>		149
	*.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****		
<i>S. typhi</i>	ATTATGCCCGGGAGCTGTTTTTCCCTGAGGGGAATATTATTTCTTTT		200
<i>S. typhimurium</i>	ATTATGCCCGGGATCTGTTTTCCCTGAAGGGGAATATTATTTCTTTT		200
pFM82139	ATTATGCCCGGAATCTGTATTCCCTGAAGGGGAATATTATGTTCTTCTTTG		199
	*****.***.*****.*****.*****.*****.*****.***		
<i>S. typhi</i>	---TTACCTGGCCCGCCCCGTCCTGTGATTGCCCAGGAGTGGGAGTTCAT		247
<i>S. typhimurium</i>	---TTAGCTGGCTGCGTCTGTCTGTTGGTTGCCCAGGAGTGGGAGTCCAT		247
pFM82139	CTGTTGTTTGTGTGTCACGCCCTGCTGTTGCCCAGGAGTGGGAGTCCAT		249
	*.***.*****.*****.*****.*****.*****.***		
<i>S. typhi</i>	AAC <b>TCCCTTGGTGGCTGATGCCCCCGCGAGGTGGA</b> ACTATTTTTCTTTT		297
<i>S. typhimurium</i>	AAC <b>TCCCCGGTGGTTGATGCCCCCGCTGTGGTGGAGT</b> CTTTTTCTTTT		297
pFM82139	AAC <b>CCCTCCGGTGGCTGATGCCCCCGCTGTGGTGGAGT</b> CTTTTTCTTTT		299
	***.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****		
<i>S. typhi</i>	ACTG <b>TCCGCCCTGCTATGCGTTCTCACAGACGATGGGCGTGG</b> CCCCGGCC		347
<i>S. typhimurium</i>	ACTG <b>CCCGCCCTGCTATGCGTTCTCACAGACAATGGGCGTGG</b> ACCAGGCC		347
pFM82139	ACTG <b>CCCGCCCTGCTATGCGTTCTCACAGACAATGGGCGTGG</b> ACCAGGCC		349
	****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***		
<i>S. typhi</i>	ATCCGGC <b>ACGTACTGCCGCACGGTGACCGGATGATCAAGTACC</b> ATGTCAG		397
<i>S. typhimurium</i>	ATCCGGC <b>ACGTACTGCCGCACGGTAGCCGGATGGTCAAATACC</b> ATGTCAG		397
pFM82139	ATCCGGC <b>ACGTACTGCCGCACGGTAGCCGGATGGTCAAAGTACC</b> ATGTCAG		399
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****		
		ApaI	
<i>S. typhi</i>	CCTGCTGGG <b>CCCCCTCGGCCATGAGCTGACACAGGCCTGGGCGTGG</b> CCA		447
<i>S. typhimurium</i>	CCTGCTGGG <b>CCCCCTCGGCCATGAGCTGACACAGGCCTGGGCGTGG</b> CCA		447
pFM82139	CCTGCTGGG <b>CCCCCTCGGCCATGAGCTGACACAGGCCTGGGCGTGG</b> CCA		449
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****		
<i>S. typhi</i>	TGATGATGAAGGAA <b>ACTGACGTGGTCGAGAAGGCCTTCTT</b> CACGGCCGAC		497
<i>S. typhimurium</i>	TGGT <b>GATGAAGGAACTGACGTGATCGAGAAGGCCTTCTT</b> CACGGCCGGC		497
pFM82139	TGGT <b>GATGAAGGAAACCGACGTGGTCGAGAAGGCCTTCTT</b> CACGGCCGGC		499
	** .*****.*****.*****.*****.*****.*****.***		
<i>S. typhi</i>	ATGGTGGAGAA <b>ACGCCTGCATTC</b> CCCGGACGATGTCCGTCGGGTGTTTAT		547
<i>S. typhimurium</i>	ATGGTGGAGAA <b>ACGCCTGCATTC</b> CCCGGACGATGTCCGTCGGGTGTTTAT		547
pFM82139	ATGGTGGAGAA <b>ACGCCTGCATTC</b> CCCGGACGATGTCCGTCGGGTGTTTAT		549
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****		
<i>S. typhi</i>	GTC <b>TGCTACCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATA</b> AAAAAGTC		597
<i>S. typhimurium</i>	GTC <b>TGCCACCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATA</b> AAAAAGTC		597
pFM82139	GTC <b>TGCCACCGGTATCAGTCGCGGGGAGTATGACAGAAGTATA</b> AAAAAGTC		599
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****		

<i>S. typhi</i>	CCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGAACGGTTGTTTAAGGAATAT	647
<i>S. typhimurium</i>	CCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGAACGGCTGTTTAAGGAATAT	647
pFM82139	CCGCCGTGAATGACATGGTGGCATTACAGGAACGGCTGTTTAAGGAATAT	649
	***** , *****	
<i>S. typhi</i>	GGCGTGAGGGGGACGCCTTCCGTGTATGTCCGTGGCCGTTACCAATATCAA	697
<i>S. typhimurium</i>	GGCGTGAGGGGGACGCCTTCCGTGTATGTCCGTGGCCGTTACCAATATCAA	697
pFM82139	GGCGTGAGGGGGACGCCTTCCGTGTATGTCCGTGGCCGTTACCAATCAA	699
	***** , *****	
<i>S. typhi</i>	CAATGCCGCCTTCCGTGCATTCTCCGTGGAAGATTTACAGGAGCCGTTATG	747
<i>S. typhimurium</i>	CAATGCCGCCTTCCGTGCATTCTCCGTGGAAGATTTACAGGAGCCGTTATG	747
pFM82139	CAATGCCGCCTTCCAGCGCATTCTCCGTGGAAGACTTCAGGAGCCGTTATG	749
	***** , * , ***** , * , *****	
<i>S. typhi</i>	CCGCGGTGGTCCGGAAACTGCTGGCCGGTAACCCGTGATGCCGACTGATGA	797
<i>S. typhimurium</i>	CTGCGGTGGTCCGGAAACTGCTGGCCGGTAACCCGTGATGCCGACTGATGA	797
pFM82139	CTGCGGTGGTCCGGAAACTGCTGGCCGGTAACCCGTGATGCCGACTGATGA	799
	* , ***** , *****	
	<i>EcoRV</i>	
<i>S. typhi</i>	TAAAGGCACCATAACAGGCCGGAGATATCCCCCGCTCCGCGCGCTGATTC	847
<i>S. typhimurium</i>	TAAAGGCACCATAACAGGCCGGAGATATCC'CCCGCTCCGTCAGCTGATTC	847
pFM82139	TAAAGGCACCATAACAGGCCGGAGATATCC'CCCGCTCCGTCGCGCTGATTC	849
	***** , ***** , ** , *****	
<i>S. typhi</i>	TCCTGCTGCTGACCAGCGTCTTTATCTCCGGCTTTCTGACCGCGCTCTG	897
<i>S. typhimurium</i>	TCCTGCTGCTGACCAGCGTCTTTATCTCCGGCTTTCTGACCGCGCTCCTG	897
pFM82139	TCCTGCTGCTGACCAGCGTCTTTATCTCCGGCTTTCTGACCGCGCTCCTG	899
	***** , **	
<i>S. typhi</i>	GCCATGCTCTGGCTTATCTGCCGTGGGGC	926
<i>S. typhimurium</i>	GTCGTGATCTGGCTTATCAGCCGTGGGAC	926
pFM82139	GCCATGCTCTGGCTTATCTGCCGTGGGGC	928
	* , * , ** , ***** , ***** , *	

**Figura 3.28.-** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos que contienen a los respectivos ORFs homólogos al *orf8* del plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Friedrich *et al.*, 1993) (representado en la Figura como *S. typhimurium*), del cromosoma de *S. typhi* 5866 y del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* 82139. El número de nucleótidos aparece a la derecha. Los asteriscos (\*) señalan nucleótidos idénticos (en negrita) (90,1%) y los puntos (.) nucleótidos repetidos en dos de las secuencias (9,3%). Los potenciales codones de iniciación y de terminación de los ORFs se marcan con doble subrayado. El posible lugar de unión a ribosomas (SD) aparece en cursiva y subrayado. Sobre las secuencias en cursiva se indican algunos puntos de corte para endonucleasas de restricción comunes a las secuencias alineadas. Las posibles secuencias promotoras se indican subrayadas. Mediante el análisis por parejas de las secuencias descritas con el programa PC/GENE los porcentajes de homología fueron de *S. typhi*/pFM82139 92,8%, *S. typhi*/*S. typhimurium* 93,6% y *S. typhimurium*/pFM82139 un 94,4%.

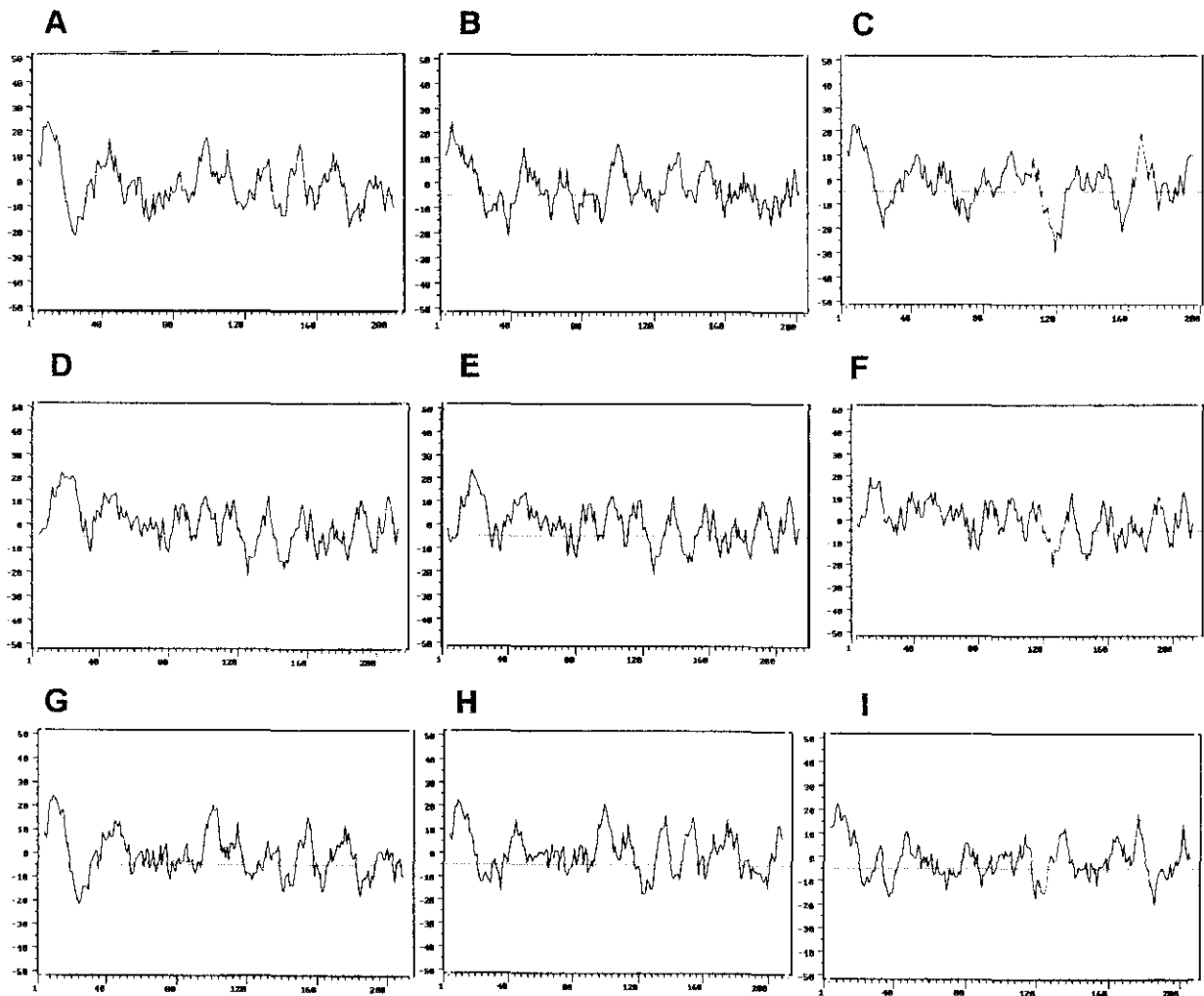
D1t	MTMNYARELFFLRGIL-FSFFLPGRARPVI---AQEWEFITPL--VADAP	44
D1e	MTMNYARNLYSLKGI LCSSLLFCCARPAV---AQEWESITPP--VADAP	45
ORF8	MTMNYARDLFSLKGI L-FSFLLAGVCVCPVV---AQEWESITPP--VVDAP	44
DsbA	<u>MKK-----IWLALA---GLVLAFSASAAQYEDGKQYTTLEKP--VAGAP</u>	39
DsbA(S)	<u>MKK-----IWLALA---GLVLAFSASAAQYEDGKQYTTLEKP--VAGAP</u>	39
DsbA(C)	<u>MKK-----LWLALA---GMVLAFSASAAQYEDGKQYATLDKP--VPQSP</u>	39
Por	<u>MKK-----VLLALGLGVSTLMSVNSFAADLQEGKQYVQVSQQ--ASQQK</u>	42
TcpG	<u>MKK-----L---FALVATLMLSVAAYAAQFKEGEHYQVLKTP--ASSSP</u>	39
DsbA(L)	M-----FKKLIGLLFLMPMTALATQFIEGKDYQTVASAOQLSTNKD	40
	* . . . . .	

D1t	ALEVELFF--FY--- <u>CPPCYAF</u> SQTMGVARAIRHVLPHGDRMIKYHVSLLG	89
D1e	AVVEFF--SFY--- <u>CPPCYAF</u> SQTMGVDQAIRHVLPQGDRMVKYHVSLLG	90
ORF8	AVVEFF--SFY--- <u>CPPCYAF</u> SQTMGVDQAIRHVLPQGSRMVKYHVSLLG	89
DsbA	QVLEFF--SFF--- <u>CPHCYQF</u> EVLHISDNVKKKLPEGVKMTKYHVNFMG	84
DsbA(S)	QVLEFFFTSFF--- <u>CPHCYQF</u> EVLHISDNVKKILPEGVKMTKYHVNFMG	86
DsbA(C)	QVLEFFFTSFY--- <u>CPHCYQF</u> AVQVYHIPDAIQKALPADAKLTKYHVDVFLG	86
Por	EVIEFF--SFY--- <u>CPHCYAF</u> EMEYKIPQQVVDALPKDVKFKQYHVNFVG	87
TcpG	VVSEFF--SFY--- <u>CPHCNT</u> FE---PIIAQLKQQLPEGAKFQKNHVSFMG	81
DsbA(L)	KTPLIFTTTEFFSYG <u>CPWCYK</u> IDAPL---NDWATRMGKGAHLERVPVVF--	85
	. * * . ** * . . . . . * .	

D1t	P-LGHEL-TQAWALAMMM--KETDVVEKAF--TADMVEKRLHSPDDVRRV	134
D1e	P-LGHEL-TRAWALAMVM--KETDVVEKAF--TAGMVEKRLHSPDDVRRV	135
ORF8	P-LGHEL-TRAWALAMVM--KETDVIEKAF--TAGMVEKRLHSPDDVRRV	134
DsbA	GDLGKDL-TQAWAVMAMALGVE--DKVTVPLFEGVQK-TQTIRSASDIRDV	130
DsbA(S)	GDLGKDL-TQAWAVVMAMALGVEFTDKVTVPLFEGVQK-TQTIRSASDIRDV	134
DsbA(C)	-ELGKEL-TQAWAVAIAMALGVEDFTKVSPLMFDVAVQK-TQTVKQPQDIRQV	133
Por	HQ-SENL-TRAWALAMALGAE--SKVKSPLFEAAQK--DALKSMDDIRAI	131
TcpG	GNMQAM-SKAYATMIALEVE--DKMVPVMPNRIHTLRKPPKDEQELRQI	128
DsbA(L)	-KPNWDLYAKAYYTAKTFLMSDFTKMNPILFKAIQEDKNPLATKQSMVDF	134
	. . . . * . . . . * . . . .	



Figura 3.29, junto con un alineamiento múltiple empleando el subprograma CLUSTAL del programa PCGENE, de las nueve secuencias homólogas. En las secuencias de Dlt y Dle se observa que una de las zonas más conservadas frente al resto de proteínas del tipo DsbA corresponde precisamente al centro activo típico de proteínas con actividad oxido-reductasa de puentes disulfuro (-Cys-X-X-Cys-)(Figura 3.29). Por otro lado se ha obtenido el perfil de hidrofobicidad de las nueve proteínas descritas previamente mediante el subprograma SOAP del programa PCGENE, observándose claramente en el extremo amino de todas ellas una región altamente hidrofóbica que correspondería al teórico péptido señal (Figura 3.30).



**Figura 3.30.**-Representación de los perfiles de hidrofobicidad de secuencias deducidas de aminoácidos homólogas a proteínas tipo DsbA pertenecientes a: (A)- *E. coli*, (B)- *H. influenzae*, (C)- *V. cholerae*, (D)- *S. typhimurium* (plásmido de virulencia), (E) *S. enteritidis* 82139 (plásmido de virulencia), (F) *S. typhi* 5866, (G) *S. flexneri*, (H) *E. chrysanthemi* y (I) *L. pneumophila*.

Por último, se procedió a ensayar la posible funcionalidad de la región promotora tanto de *dle* como de *dff* realizando fusiones génicas con *lacZ* utilizando los plásmidos YEp. Para llevar a cabo este experimento se procedió a la clonación en el plásmido YEp357R digerido con las endonucleasas de restricción *SalI* y *SmaI* de los fragmentos *XhoI/StuI* de 1,3 kb procedente del plásmido pXHSM y *SalI* (punto perteneciente al *polylinker* del vector de clonación)/*StuI* de 653 pb perteneciente al plásmido pNS (Figura 3.27). Se eligió el vector YEp357R debido a que de los disponibles de la serie YEp era el que mantenía el marco de lectura correcto en la fusión génica tras la ligación de los extremos *SmaI* y *StuI* (situado en el caso de *dle* a 346 pb y en *dff* a 294 pb del teórico codón de iniciación), a la vista de los marcos de lectura observados en las secuencias obtenidas. En ambos casos se obtuvieron transformantes presentando fusiones positivas, indicando la funcionalidad de las regiones promotoras estudiadas.

## 4.- DISCUSIÓN

El análisis de la virulencia de *Salmonella* se ha centrado fundamentalmente en el serotipo *S. typhimurium*. Esto se debe a haber considerado la infección del ratón por *S. typhimurium* como un modelo de la infección humana por *S. typhi*, es decir, como modelo animal de la fiebre tifoidea. Sin embargo, para la infección en ratón por *S. typhimurium* es esencial el plásmido de virulencia, mientras que *S. typhi* carece de él. Por otra parte, este tipo de modelos experimentales soslayan precisamente las características del patógeno que lo hacen específico de sus huéspedes.

*S. typhimurium*, al igual que la mayoría de serotipos no tifoideos de *Salmonella*, produce gastroenteritis en el hombre, y de forma oportunista, septicemia. La presencia del plásmido de virulencia podría estar relacionada con su capacidad de invasión sistémica, si se considera que es más frecuente en aislados de sangre que de heces (Montenegro *et al.*, 1991; Fierer *et al.*, 1992), pero no hay prueba alguna. De momento, se desconoce si el plásmido de virulencia tiene alguna función en la patogénesis humana.

Además del plásmido de *S. typhimurium*, se han caracterizado los de *S. dublin*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*, pero en mucha menor medida. Dado que el serotipo *S. enteritidis* es el que se aísla con mayor frecuencia en España (Usera *et al.*, 1995), fue el elegido para este trabajo, como se ha indicado en Objetivos, utilizando una cepa aislada de una muestra de heces durante un brote de gastroenteritis (*S. enteritidis* 82139).

#### **4.1.- Cartografiado del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* y su comparación con el de *S. typhimurium*.**

El tamaño del plásmido de virulencia presente en *S. enteritidis* 82139 se evaluó en 60 kb mediante la suma de fragmentos obtenidos por restricción, coincidiendo con el descrito por diversos grupos (Guiney *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1993) y ligeramente superior a otras cifras publicadas (Suzuki *et al.*, 1994; Helmuth *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1985). Como estos autores se basaron en la migración del plásmido sin cortar, método poco exacto cuando se trata de plásmidos de elevado tamaño, o en análisis de restricción poco detallados, lo más probable es que todos los plásmidos de virulencia de *S. enteritidis* tengan idéntico tamaño.

Montenegro *et al.* (1991) realizaron un estudio comparativo de homología entre los plásmidos de virulencia de distintos serotipos mediante el análisis por microscopía electrónica de los heterodúplex formados entre los mismos, y observaron que el 99% del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* hibridaba con el de *S. typhimurium*, apoyando la idea de la existencia de un ancestro común. El plásmido de *S. typhimurium* es de dimensiones considerablemente mayores (91 kb).

En el presente trabajo se presenta un mapa detallado del plásmido de *S. enteritidis*, cuyo cartografiado exhaustivo no se había acometido hasta el momento. En este mapa se detallan 42 puntos de corte de 7 enzimas de restricción, facilitando la localización y clonación de diversas partes del plásmido y haciendo posible posteriores estudios genéticos.

La comparación entre nuestro mapa de *S. enteritidis* y el del plásmido de *S. typhimurium* publicado por Tinge y Curtiss III (1990a), nos ha permitido detectar variaciones en el patrón de corte de endonucleasas de restricción; así como, a través de hibridaciones entre sus fragmentos *HindIII*, localizar las zonas del plásmido de *S. typhimurium* de las cuales carecía el plásmido objeto de estudio.

Del análisis de las hibridaciones citadas se dedujo que, de los siete fragmentos *HindIII* obtenidos del plásmido de *S. enteritidis*, tres de ellos (pMJ001-pMJ004-pMJ002A), situados de forma contigua, eran homólogos a los del mismo tamaño procedentes de la digestión con *HindIII* del plásmido de *S. typhimurium*. Otros dos fragmentos (pMJ003 y pMJ005) presentaron la desaparición de un punto de corte *HindIII* en cada caso dando lugar a bandas de mayor tamaño en *S. enteritidis*, pero permaneciendo constante la suma global de tamaños. Es importante resaltar que esta zona altamente conservada contiene, entre otros, los genes *spv*, las regiones implicadas en el mantenimiento plasmídico (las responsables de su replicación, el sistema de resolución de multímeros y la región de partición).

Los dos fragmentos *HindIII* restantes (pMJ006 y pMJ002B), hibridaron con bandas del plásmido de *S. typhimurium* de un tamaño claramente superior, 8 y 22 kb mayores respectivamente, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Montenegro *et al.* (1991). En suma, las 30 kb totales de diferencia detectadas coinciden con la diferencia de tamaño de ambos plásmidos.

En el caso del clon pMJ006, contiguo al fragmento que integra la mayor parte de la región *par* (pMJ005), la divergencia debe localizarse en la parte distal con respecto a pMJ005, según podemos deducir del patrón de restricción y de la comparación en bancos de datos de la secuencia obtenida del mismo, ya que en la parte media de pMJ006 y en dirección hacia pMJ005 se ha detectado el operón *samAB*, muy conservado entre los plásmidos de virulencia de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

En el caso del inserto contenido en pMJ002B, y dada la gran diferencia de tamaño observada, era difícil afirmar, basándose sólo en la comparación de patrones de restricción, cuáles eran las zonas más conservadas. No obstante, se mantienen ciertos puntos de corte para endonucleasas de restricción situados en el extremo del fragmento que limita con con la banda *HindIII* que contiene la mayor parte de *repB*.

## 4.2.- Mapa génico del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*.

Desde que se empezaron a estudiar los plásmidos de virulencia de distintos serotipos de *Salmonella* se han ido describiendo y localizando, según el caso, sucesivos genes, grupos de genes o regiones a las cuales se ha intentado asignarles una función. Hasta el momento todos estos datos han ido surgiendo de una manera dispersa y a través de grupos especializados en

serotipos específicos, lo que no es de extrañar si se tiene en cuenta el elevado tamaño que presentan los diferentes plásmidos de virulencia y la gran cantidad de información que albergan.

Por todo ello, se planteó elaborar un mapa génico del plásmido de *S. enteritidis* 83219 previamente cartografiado, con el objetivo de completar su caracterización y a la vez unificar todos los datos disponibles de otros plásmidos, cuando fuera posible, sobre el de *S. enteritidis*. Para lograrlo se planteó como estrategia la secuenciación parcial de un número elevado de subclones plasmídicos procedentes de la genoteca inicial *HindIII*, apoyándonos en la comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en bancos de secuencias internacionales.

De esta manera se ha obtenido la distribución precisa en el plásmido en estudio de todas las secuencias homólogas halladas, como se representa en la Figura 3.14 de Resultados. Igualmente han quedado totalmente acotadas tanto las regiones no homólogas a ninguna secuencia descrita, lo cual facilitará posteriores estudios de las mismas si se consideran necesario, como las homólogas a secuencias no descritas anteriormente en los plásmidos de virulencia que suponen nuevos avances en su caracterización.

En el plásmido de *S. enteritidis* se han detectado y localizado todos los genes descritos previamente en diferentes plásmidos de virulencia, con la excepción de *traT* y *vagC/vagD*.

El análisis detallado del plásmido de virulencia de *S. enteritidis* nos permite resumir su organización genética definiendo una serie de bloques, tomando como referencia los grupos de genes descritos en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (*spv*, replicación y partición (*repB*, *repC* y *par*), *samAB*, *tra*, y síntesis de fimbrias (*pef*)), e incluyendo las regiones más próximas a ellos. En conjunto, la imagen que produce es de ser el resultado de diversos procesos de recombinación, a pesar de que no se han observado secuencias indicativas de elementos transponibles (salvo un extremo de IS630, sin haberse comprobado si está el elemento completo; esta secuencia de inserción se ha descrito cerca de la zona *spv* del plásmido de *S. dublin*). Gran parte de los genes carecen de funcionalidad, como *tra*, o su función parece carecer de utilidad, como *pef* y *samAB*. Sin embargo, se mantienen al menos en los serotipos Enteritidis y Typhimurium. Resulta sorprendente el esfuerzo por conservar una plásmido de estas dimensiones, con dos replicones y dos sistemas de partición, cuando hasta el momento sólo se ha mostrado importante (pero no indispensable) la región *spv* en la infección experimental del ratón.

#### 4.2.1.- Región *spv*.

El operón *spv* ha sido estudiado con detalle por numerosos investigadores, que han descrito su regulación. No presenta relación destacable con otros genes descritos, exceptuando el producto de *spvR* (Guiney *et al.*, 1994; Gulig *et al.*, 1993).

En el plásmido de virulencia de *S. dublin* se hallan próximos al operón *spv* los genes *vagC/vagD*, implicados en el crecimiento en medios con limitación de nutrientes. No puede

afirmarse categóricamente su ausencia en el plásmido de *S. enteritidis*, aunque sea lo más probable. Hasta el momento estos genes se han detectado únicamente en el plásmido de *S. dublin* y están ausentes en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* (Pullinger y Lax, 1992). Además, la zona donde se sitúan en *S. dublin* está relativamente próxima a la región *spv*, zona muy conservada entre los plásmidos de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, donde nosotros no hemos observado zonas no homólogas entre ellos. Se ha realizado además un intento de detección utilizando PCR y cebadores correspondientes a *vagC/vagD*, sin observar amplificación. Este ensayo no es concluyente porque no se ensayó la amplificación a partir del plásmido de *S. dublin*, pero en las mismas condiciones se amplificaron otros fragmentos similares, como *traT* y *rok* (Buisán *et al.*, 1994).

Es importante tener en cuenta que el plásmido de virulencia de *S. dublin* es el que menor homología presenta con los de los restantes serotipos estudiados (Montenegro *et al.*, 1991), y que en él la región *vagC/vagD* parece tener una función de mantenimiento (Pullinger y Lax, 1992), ya que carece de *repC*, presente en los otros plásmidos de virulencia.

Una de las regiones de los plásmidos de virulencia que permanecen sin caracterizar es la situada en pMJ001 entre los genes *spv* y *tlpA*. Se ha obtenido una fusión génica positiva con *lacZ*, mostrando la existencia de una posible actividad promotora, que tendrá que ser caracterizada en mayor profundidad para poder relacionarla con algún ORF. De hecho, en un estudio de expresión de proteínas realizado en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, y empleando una región similar a la utilizada por nosotros en pMJ001, dió lugar a la producción de una proteína de 64 kDa (Norel *et al.*, 1989b).

#### **4.2.2.- Las regiones de replicación y partición.**

Los dos replicones presentes en el plásmido, (*repC* y *repB*) caracterizados en un trabajo previo (Buisán, M. 1995), pertenecen a distinto grupo de incompatibilidad, (IncFI e IncFII), y su homología con otros descritos (pColV-K30 de *E. coli* y el plásmido de virulencia de *Yersinia enterocolitica*, respectivamente) es lo bastante elevada para sugerir un origen independiente y próximo a los de dichos plásmidos. La región de partición es también doble (Buisán, M. 1995.). La presencia del gen *tlpA* próximo a la región de partición, cuyo producto tiene una estructura semejante a proteínas implicadas en la segregación de cromosomas (*MukB* de *E. coli*) nos hace pensar que pueda estar también implicado en la partición.

#### **4.2.3.- Región no homóloga entre *samAB* y la región *tra*.**

A pesar de los estudios realizados en los últimos años todavía permanecen regiones de los plásmidos de virulencia sin caracterizar. En el plásmido que nos ocupa dichas regiones, que no mostraron homología con secuencia alguna, quedan prácticamente circunscritas a las zonas

colindantes entre sí de los clones pMJ006 y pMJ002B, y la región anteriormente reseñada de pMJ001. Con un fragmento de pMJ002B, que no presentaba homología con genes conocidos, se obtuvo una fusión génica positiva con *lacZ* mostrando la existencia de actividad promotora en esa región.

Del clon pMJ006, donde se detectó homología con una banda *HindIII* superior en 8 kb a la correspondiente del plásmido de *S. typhimurium*, se llevó a cabo su secuenciación completa en una sola cadena de DNA, comprobándose que en su parte media se situaba el comienzo del operón *samAB* con una dirección de transcripción hacia el clon pMJ005. La elevada conservación de esta zona entre los plásmidos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, no sólo detectada por homología, sino también por el patrón de restricción, indica que la diferencia de tamaño observada no afecta a esta primera parte.

La segunda mitad de pMJ006, colindante con pMJ002B, no mostró homología con ninguna secuencia depositada en banco de secuencias, ni de DNA ni de los polipéptidos deducidos de sus posibles ORFs. Por tanto, aunque sea esta parte donde se localice la diferencia de tamaño, la ausencia de homología con secuencias descritas no permite situar con mayor precisión el lugar donde pudiera radicar la divergencia. Tampoco se puede decir si su origen es una delección del plásmido de *S. typhimurium* o una inserción en el de *S. enteritidis*. Para aclararlo será necesario proceder a la secuenciación y caracterización genética de esta región tanto en el plásmido de *S. typhimurium*, como en el de *S. enteritidis*.

#### 4.2.4.- Región *tra*.

En el clon pMJ002B se localiza la mayor diferencia observada entre los plásmidos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. Se planteó su caracterización detallada por dos motivos: por un lado para poder localizar con precisión la diferencia de tamaño y por otro para buscar secuencias homólogas a genes de transferencia que no se habían descrito anteriormente en los plásmidos de virulencia, a excepción del origen de transferencia, detectado por hibridación (Ou *et al.*, 1994), y de *traT*, ausente en nuestro plásmido.

De los datos de secuencia, se ha deducido la existencia de una parte de los genes que forman el operón de transferencia de plásmidos tipo IncF (Frost *et al.*, 1994) (su distribución en el plásmido F se detalla en la Introducción) con homologías en DNA de un 70-80%. La región presente estaría comprendida en un primer bloque entre *oriT* y la parte final de *trbD*, interrumpiéndose por una delección de aproximadamente 228 pb (que afecta a *trbD* y *trbG*) con respecto a la misma zona del plásmido F. A partir de este punto se detectó homología con *traV*, para desaparecer hasta la zona correspondiente a *finO* (último gen del operón). La zona ausente respecto a F abarca 25,5 kb e incluye *traT*. Este gen, además de pertenecer al grupo de genes de transferencia, media resistencia al suero.

Además, se ha demostrado la ausencia de *traT* en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, tanto a través de estudios de amplificación mediante PCR como de hibridación con una sonda procedente de *traT* del plásmido de *S. typhimurium*. Este resultado concuerda con los ensayos de hibridación realizados entre los plásmidos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, de los que se deduce que *traT* se localizaría en la fracción suplementaria que presenta en esta región el plásmido de *S. typhimurium*, pero contradice lo publicado por Sukupolvi *et al.* (1990) que postulaban su presencia en el plásmido de *S. enteritidis*.

Estos resultados aportan una información valiosa sobre la genealogía del plásmido de virulencia de *S. enteritidis*; ya que es altamente improbable que el plásmido de *S. typhimurium* derive del de *S. enteritidis* por inserción de *traT*, probablemente junto con otros genes *tra*, para dar lugar, debido a las diferencias de tamaño observadas, a un operón aún incompleto, mientras que es más factible que se haya producido una deleción que reduzca el tamaño de la región *tra*, ya no funcional (Ou *et al.*, 1990).

Dentro de la región *tra* presente en el plásmido en estudio se ha localizado el promotor principal del operón de transferencia (Py), y mediante fusiones génicas con el gen *lacZ* se ha demostrado su funcionalidad, implicando que probablemente en un ancestro originario de los plásmidos de virulencia hubiera podido existir una región *tra* funcional.

El estudio de las regiones *tra* pertenecientes a plásmidos de diferentes subgrupos de incompatibilidad dentro de IncF ha permitido elaborar una clasificación por grupos de complementación de ciertos genes (Willetts y Maule, 1985), que puede proporcionar una idea sobre el origen de una región dada.

En el caso de la región *tra* del plásmido de *S. enteritidis*, varias de las secuencias obtenidas mostraron la máxima homología con genes de grupos de complementación pertenecientes a plásmidos IncFII, concretamente R1 y pColB4-K98.

A pesar de este mayor parentesco, las comparaciones de la región *tra* del plásmido estudiado se han hecho con F, ya que es el único del que se dispone de la secuencia completa de *tra* (Frost *et al.*, 1994). Será necesario observar la homología con las nuevas secuencias que se publiquen de estas regiones pertenecientes a plásmidos conjugativos del complejo IncF para poder asignar a la presente en *S. enteritidis* un origen concreto. En apoyo a la idea expresada de que el origen de los genes de transferencia sea de una región procedente de un plásmido IncFII está su situación muy próxima en el plásmido al replicón *repB*, que también presenta una mayor homología con plásmidos IncFII, concretamente R100 y pYVe439-80, este último el plásmido de virulencia de *Yersinia enterocolitica*. El hecho de que la mayor homología detectada sea con la región *tra* de plásmidos IncFII, y su vecindad al replicón *repB*, también IncFII, sugiere que ambas regiones se hayan incorporado al plásmido como un solo bloque de genes. La dificultad para establecer un origen deriva de la información fragmentaria sobre las regiones *tra* y *rep*, ya que en los plásmidos con los que se observa mayor homología no se dispone de la secuencia completa de ambas.

En el proceso de elaboración del mapa génico se detectó, a continuación de la región *tra* y antes de *repB* en el clon pMJ002B, una secuencia homóloga a la endonucleasa *nuc* del plásmido conjugativo pKM101, hasta el momento no descrita en ningún plásmido de virulencia. Este ORF fue denominado *nle* y su producto deducido mostró una identidad de un 35,5% con Nuc. La secuencia de aa deducida de *nle* presenta en su secuencia total 18 aa menos que Nuc, esta diferencia se debe muy posiblemente a una delección puntual o a una inserción de dos nucleótidos sufrida en la región 3' de *nle* a partir de la cual la secuencia deducida de aminoácidos pierde totalmente la identidad con Nuc y además termina prematuramente. Será necesario para confirmar esta posibilidad proceder a la obtención de la secuencia de la cadena complementaria, así como realizar un experimento de expresión de proteínas. En el plásmido pKM101 *nuc* se encuentra situada entre dos agrupaciones de genes *tra*, aunque no se ha descubierto ningún proceso celular en el que participe, su localización ha hecho postular que ancestralmente estuviese relacionada con el proceso de conjugación (Pohlman *et al.*, 1993). De forma análoga en ciertos plásmidos del complejo IncF se ha descrito detrás de *finO* la presencia de un ORF cuyo producto deducido presenta homología con nucleasas; y esta parece ser la situación en el plásmido de *S. enteritidis*. Puesto que la identidad en DNA entre *nuc* y *nle* es muy baja, no se puede considerar una relación filogenética cercana entre ambas secuencias. Por ello, será necesario esperar a que se lleve a cabo la secuenciación de estas regiones de diversos plásmidos, y concretamente de R1 y pColB4-K98, para poder esclarecer su origen.

#### 4.2.5.- Zona *pefl-dle* y región homóloga cromosómica de *S. typhi*.

Solapándose parcialmente con el operón plasmídico de síntesis de fimbrias, *pef*, se detectó una región homóloga con DNA cromosómico de *S. typhi*, y que mostró también homología con el cromosoma de *S. enteritidis*. Este resultado tiene interés si se considera que *S. typhi*, patógeno específico del hombre, carece de plásmido de virulencia conocido, y cabe preguntarse si contiene en su cromosoma regiones que suplan esa falta. Dado que *S. typhi* produce infección sistémica, y que el plásmido de virulencia es necesario para este tipo de infección en animales, parece lógico que exista cierta contrapartida en su cromosoma.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto la existencia de esas regiones homólogas tras realizar, en condiciones de máximo rigor, hibridaciones DNA-DNA empleando como sondas todos los fragmentos *HindIII* del plásmido de *S. enteritidis* frente a DNA total de *S. typhi*. Se detectó hibridación sólo con uno de los clones, pMJ003, que corresponde a la zona del plásmido de *S. typhimurium* que también ha mostrado homología con *S. typhi* (Korpela *et al.*, 1989), y que contiene la región de síntesis de fimbrias *pef*.

La clonación del fragmento *BamHI* de 13 kb del cromosoma de *S. typhi*, que contenía la región homóloga al clon pMJ003 del plásmido de virulencia, permitió comprobar que está

integrada por una región que corresponde a cuatro ORFs descritos previamente en el plásmido de *S. typhimurium* (Friedrich *et al.*, 1993). Estos son *pefI* (un posible gen regulador del operón *pef* de síntesis de fimbrias), *orf7* de función desconocida (su producto teórico presenta homología con ciertas proteínas de función reguladora en bacterias), y por último *orf8* y *orf9* de funciones desconocidas. El tamaño de la zona homóloga es de aproximadamente 2,6 kb, y las secuencias cromosómicas y plasmídicas presentan más del 88% de homología con las descritas del plásmido de *S. typhimurium*. El contenido G+C de la región homóloga secuenciada en doble cadena que contiene tanto a *dlt* como a *dle* es próximo a un 55%, como el descrito para el cromosoma de *Salmonella*, lo que hace suponer que sea una región propia de *Salmonella* y no procedente de otro origen.

Tanto en el DNA de la cepa de *S. enteritidis* portadora del plásmido de virulencia como en otra carente de él, se observó hibridación con las sondas empleadas contra el cromosoma de *S. typhi*, en este caso con una banda *HindIII* próxima a 5 kb. Esto es indicativo de que la presencia de secuencias homólogas a tales ORFs en el cromosoma de *S. typhi* no se debe a la ausencia de plásmido de virulencia, sino que són comunes al menos en algún serotipo de *Salmonella*, coexistiendo con sus alelos plasmídicos. Para confirmar esta hipótesis será necesario analizar un cierto número de serotipos. Es importante destacar que la región homóloga en el plásmido de virulencia está situada fuera de la región *spv* y por tanto se encuentra en la zona que se ha observado dispensable para la virulencia en animales de los serotipos portadores de plásmidos de virulencia. Esto plantea cual será su función en la bacteria, y si su presencia en plásmido de virulencia y cromosoma, como es el caso de *S. enteritidis*, puede significar ciertas ventajas.

De la comparación en bancos de datos de las secuencias conservadas en plásmido y cromosoma tomando como base las publicadas del plásmido de virulencia de *S. typhimurium*, destaca la observación de que el producto deducido del *orf8* presenta homología con proteínas tipo DsbA, mientras que la secuencia de nucleótidos no presenta homología significativa con ningún gen. Estas proteínas, ampliamente distribuidas en procariontes, presentan una actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro en periplasma. Mutantes deficientes en DsbA presentan alteradas múltiples funciones dependientes de proteínas de exportación, que para ser activas necesiten la formación de puentes disulfuro (Bardwell, 1994). Dado que en *Salmonella* el gen codificante de una proteína de este tipo no había sido descrito hasta el momento pareció interesante comenzar su caracterización, teniendo en cuenta la importancia que puede tener en diversos pasos de su ruta de infección. De la secuenciación en doble cadena de los correspondientes ORFs, tanto del cromosoma de *S. typhi* como del plásmido de *S. enteritidis*, y que denominamos respectivamente *dlt* (654 pb) y *dle* (657 pb) se observó que sus secuencias deducidas de aminoácidos presentaban una identidad de un 23-34% con diversas proteínas DsbA pertenecientes a diferentes especies bacterianas, concretamente las de *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Erwinia chrysanthemi*, *Haemophilus influenzae* y *Vibrio cholerae*. En cuanto a la posibilidad de que

Dle y Dlt realmente presenten una actividad tipo DsbA, esta se puede considerar como muy probable si se tiene en cuenta, a parte del porcentaje de identidad descrito, la conservación de una serie características propias de proteínas tipo DsbA. Estas se pueden concretar en cuatro: 1) presencia en la región amino-terminal de una región altamente hidrofóbica que puede actuar como péptido señal, como corresponde a una localización en el periplasma de la célula; además, se ha observado que el producto del *orf8* de *S. typhimurium* presenta también una localización extracitoplásmica, 2) una alta conservación de la secuencia en torno al motivo característico del centro activo típico de esta tipo de enzimas (Cys-X-X-Cys); 3) presencia de un residuo de prolina en la región carboxilo-terminal de la proteína, conservado en todas las proteínas DsbA descritas hasta el momento, que en la estructura tridimensional de la proteína se sitúa en una posición característica y 4) un tamaño semejante de 200-218 aa. Además, la detección en las secuencias de *dlt* y *dle* de un potencial promotor y lugar de unión a ribosomas, junto con la actividad detectada en las fusiones génicas con *lacZ*, apoyan lo expuesto anteriormente.

En lo que se refiere a la importancia que puede tener esta proteína en la patogénesis de *Salmonella*, se han descrito casos en los que la actividad DsbA es necesaria para la funcionalidad de diversos determinantes de virulencia que contienen puentes disulfuro en sus estructuras definitivas. Este el caso, como se ha indicado en la Introducción, de toxinas, como las enterotoxinas termoestables I y II de *E. coli* y la subunidad A de la toxina colérica, la síntesis de fimbrias *pap* de *E. coli*, y de proteínas *lpa* necesarias para la invasión por parte de *Shigella*. Por todo ello será importante, especialmente en el caso de *S. typhi*, obtener cepas mutantes en *dsbA* para poder valorar en que grado y en que condiciones se ve afectada su virulencia. Y en el caso de *S. enteritidis* valorar las ventajas, sí acaso, de presentar copias cromosómica y plasmídica.

De la secuenciación parcial del resto de la secuencia contenida en el fragmento de 13 kb *Bam*HI procedente de *S. typhi* se han podido detectar, antes de la zona homóloga al plásmido de virulencia que contiene a *dlt*, los genes *sefA*, *C* y *D* existiendo una distancia adecuada entre *sefA* y *sefC* para que se ubique *sefB*. Estos genes forman parte de los aún incipientemente caracterizados operones de fimbrias SEF14 y SEF18 descritos en *S. enteritidis* (Clouthier *et al.*, 1994; Turcotte y Woodward, 1993). Aunque se conocía su presencia en *S. typhi*, los datos obtenidos son los primeros de secuencia que muestran el elevado nivel de conservación con las secuencias de *S. enteritidis*. Cabe plantearse, volviendo al caso de *dlt* y *dle*, que no sea mera casualidad su situación próxima a operones de fimbrias, en el caso del plásmido de virulencia a *pef* y en el caso cromosómico a *sef*. Se ha observado que la formación de puentes disulfuro en el periplasma es esencial para en correcto ensamblaje de las fimbrias *pap* de *E. coli* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994). Además, es interesante destacar que junto a *dlt*, se localiza también en el cromosoma la secuencia homóloga a *pefl*, que podría formar parte del conjunto de genes *sef*.

Finalmente, dar cuenta de dos secuencias obtenidas en el proceso de secuenciación parcial del clon cromosómico, que mostraron homologías significativas en bancos de genes. Una de ellas,

detectada inmediatamente detrás de la secuencia homóloga al *orf9*, corresponde con elevado grado de conservación a la situada en la región anterior a la zona promotora del sistema de restricción-modificación *SinI* de *S. infantis*. Según se desprende de la secuencia obtenida de la zona, de haber estado presente el sistema *SinI*, se encontraría en la zona ocupada por la región homóloga plásmido/cromosoma anteriormente descrita. Y la otra, situada en el extremo del fragmento cromosómico opuesto a los genes *sef*, perteneciente a un ORF denominado *mcrD*, que se sitúa a continuación del sistema de restricción *mcrBC* de *E. coli*, mostrándose colindantes sus regiones terminadoras (Burland *et al.*, 1995), y que en el caso que nos ocupa se encuentra truncado de forma súbita. El sentido de transcripción de *mcrD* en *E. coli* es opuesto al de *mcrBC* y en el caso de la secuencia homóloga detectada en el cromosoma de *S. typhi* la dirección de transcripción de *mcrD* es hacia el interior del clon cromosómico pST93. Esto indica que de conservarse la distribución de estos genes en *Salmonella* deberían encontrarse dentro de pST93, genes que no han sido detectados en las secuencias procedentes de los subclones realizados.

La presencia de estas regiones aparentemente truncadas por la presencia de *dlt* y las restantes secuencias homólogas al plásmido parece indicar que esta zona del cromosoma de *S. typhi* ha sido objeto de procesos de recombinación genética. La presencia de un operón biosintético de fimbrias adyacente a esta región, tanto en el plásmido (*pef*) como en el cromosoma de *S. typhi*, podría reforzar esta idea, pero la relación entre ambos es puramente funcional, ya que la homología es muy baja. La recombinación podría haberse producido por presentar ambos operones un gen altamente homólogo, que sería *pefI*, en el plásmido, y la secuencia que hemos denominado *1* en el cromosoma *S. typhi*. En realidad, *PefI* recibió esta denominación por ser homólogo a *PapI*, del operón de síntesis de fimbrias P de *E. coli*, donde actúa como regulador, pero no se conoce su función, y es posible que exista también el correspondiente regulador de *sef*, *sefI*, que no se ha descrito en la caracterización del operón (Clouthier *et al.*, 1994; Clouthier *et al.*, 1993), probablemente por no ser esencial.

# CONCLUSIONES

1. La obtención de un mapa de restricción detallado de un plásmido de virulencia representativo de *Salmonella enteritidis* ha permitido comparar su organización con respecto al plásmido de virulencia de *Salmonella typhimurium* y servir de base para su estudio genético.
2. La comparación entre los mapas de restricción y los resultados de hibridación entre los distintos fragmentos de ambos plásmidos, indican que difieren fundamentalmente en dos regiones suplementarias que posee el plásmido de *S. typhimurium*.
3. La caracterización mediante secuenciación parcial de la región *tra* del plásmido de *S. enteritidis* demuestra la ausencia de un alto porcentaje de la misma, incluyendo *traT*, que si está presente en el plásmido de *S. typhimurium*, siendo probablemente ésta la mayor de las regiones divergentes entre ambos plásmidos. Estos datos, junto con los aportados anteriormente indican que el plásmido de *S. enteritidis* procede del de *S. typhimurium*, o de un ancestro común, a través de deleciones; habiéndose determinado tanto los genes *tra* presentes como ausentes, tomando como prototipo la región *tra* del plásmido F. La región *tra* del plásmido de *S. enteritidis* presenta mayor homología con regiones *tra* de plásmidos IncFII que con la de F.
4. La consecución de un mapa génico del plásmido de *S. enteritidis* ha permitido unificar sobre él todos los datos conocidos en los plásmidos de otros serotipos, observándose un alto grado de conservación entre los mismos. Además, la existencia de un mapa génico detallado permite localizar con exactitud las zonas no caracterizadas del mismo facilitando posibles estudios posteriores.
5. Se ha localizado en el plásmido de *S. enteritidis* un posible marco abierto de lectura cuya secuencia de aminoácidos deducida presenta homología con la endonucleasa *nuc* del plásmido conjugativo pKM101, siendo esta la primera vez que se describe en los plásmidos de virulencia de *Salmonella*. Su localización próxima a la región *tra* de ambos plásmidos induce a pensar su relación ancestral con procesos conjugativos.
6. Se ha demostrado de una forma inequívoca la existencia de regiones conservadas entre el plásmido de virulencia de *S. enteritidis* y los cromosomas de *Salmonella typhi*, serotipo sin plásmido de virulencia conocido, y de *S. enteritidis*.

7. De la clonación y secuenciación de la región homóloga detectada en *S. typhi* se ha comprobado que esta zona abarca aproximadamente 2,6 kb y está compuesta por secuencias homólogas a los ORFs *pefl*, *orf7*, *orf8* y *orf9*, descritos previamente en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*.

8. El producto deducido del *orf8*, su homólogo presente en *S. typhi*, denominado *dlt*, y el presente en el plásmido de virulencia de *S. enteritidis*, denominado *dle*, presentan cierto grado de identidad con proteínas tipo DsbA, de actividad óxido-reductasa de puentes disulfuro en periplasma. La secuencia de aminoácidos deducida de la de nucleótidos de *dlt* y *dle* presentan características comunes con este tipo de proteínas, incluyendo el centro activo, por lo que se puede esperar que tengan una actividad semejante en *Salmonella*.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abe, A. y Kawahara, K. 1995. Transcriptional regulation and promoter sequence of the *spvR* gene of virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 225-230.
- Abe, A., Matsui, H., Danbara, H., Tanaka, K., Takahashi, H. y Kawahara, K. 1994. Regulation of *spvR* gene expression of *Salmonella* virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. *Mol. Microbiol.* **12**: 779-787.
- Austin, S.J. 1988. Plasmid partition. *Plasmid* **20**: 1-9.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1993. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Bardwell, J.C.A. 1994. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14**: 199-205.
- Bardwell, J.C.A., Lee, J.-O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. y Beckwith, J. 1993. A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1038-1042.
- Bardwell, J.C.A., McGovern, K. y Beckwith, J. 1991. Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**: 581-589.
- Barrow, P.A. y Lovell, M.A. 1988. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2307-2316.
- Barrow, P.A., Simpson, J.M., Lovell, M.A. y Binns, M.M. 1987. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect. Immun.* **55**: 388-392.
- Bäumler, A.J. y Heffron, F. 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**: 2087-2097.
- Belin, P. y Boquet, P.L. 1994. The *Escherichia coli dsbA* gene is partly transcribed from the promoter of a weakly expressed upstream gene. *Microbiology.* **140**: 3337-3348.
- Birboim, H.C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Buisán, M. 1995. Caracterización del plásmido de virulencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Buisán, M., Rodríguez-Peña, J.M. y Rotger, R. 1994. Restriction map of the *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and its homology with the plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **16**: 165-169.
- Burland, V., Plunkett III, G., Sofia, H.J., Daniels, D.L. y Blattner, F.R. 1995. Analysis of the *Escherichia coli* genome VI: DNA sequence of the region from 92.8 through 100 minutes. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2105-2119.
- Caldwell, A.L. y Gulig, P.A. 1991. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene. *J. Bacteriol.* **173**: 7176-7185.
- Cerin, H. y Hackett, J. 1989. Molecular cloning and analysis of the incompatibility and partition functions of the virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **7**: 85-99.
- Cerin, H. y Hackett, J. 1993. The *parVP* region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid pSLT contains four loci required for incompatibility and partition. *Plasmid* **30**: 30-38.
- Chen, C., Buchmeier, N.A., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M. y Guiney, D.G. 1995. Central regulatory role for the RpoS Sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J. Bacteriol.* **177**: 5303-5309.
- Chikami, G.K., Fierer, J. y Guiney, D.G. 1985. Plasmid-mediated virulence in *Salmonella dublin* demonstrated by use of a Tn5-*oriT* construct. *Infect. Immun.* **50**: 420-424.
- Clegg, S. y Gerlach, G.F. 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* **169**: 934-938.
- Close, S.M. y Kado, C.I. 1992. A gene near the plasmid pSa origin of replication encodes a nuclease. *Mol. Microbiol.* **6**: 521-527.
- Clouthier, S.C., Collinson, S.K. y Kay, W.W. 1994. Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis*. *Mol. Microbiol.* **12**: 893-903.
- Clouthier, S.C., Müller, K.-H., Doran, J.L., Collinson, S.K. y Kay, W.W. 1993. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* **175**: 2523-2533.
- Cotton, F.A., Hazen, E.E. y Legg, M.J. 1979. Staphylococcal nuclease: proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3', 5'-biphosphate-calcium ion complex at 1.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 2551-2555.
- Coynault, C., Robbe-Saule, V., Popoff, M.Y. y Norel, F. 1992. Growth phase and SpvR regulation of transcription of *Salmonella typhimurium spvABC* virulence genes. *Microb. Pathog.* **13**: 133-143.

- Curtiss III, R., MacLeod, D.L., Lockman, H.A., Galán, J.E., Kelly, S.M. y Mahairas, G.G. 1993. Colonization and invasion of the intestinal tract by *Salmonella*. En: Cabello, F., Hormaeche, C., Mastroeni, P. y Bonina, L. (Eds.) *Biology of Salmonella*. Plenum Press. New York. pp.191-198.
- Dailey, F.E. y Berg, H.C. 1993. Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1043-1047.
- De Graaf, F.K. 1990. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**: 29-53.
- Doran, J.L., Collinson, S.K., Burian, J., Sarlós, G., Todd, E.C.D., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, P.I. y Kay, W.W. 1993. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2263-2273.
- Fang, F.C., Krause, M., Roudier, C., Fierer, J. y Guiney, D.G. 1991. Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. *J. Bacteriol.* **173**: 6783-6789.
- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J. y Guiney, D.G. 1992. The alternative sigma factor katF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 11978-11982.
- Fierer, J., Eckmann, L., Fang, F., Pfeifer, C., Finlay, B.B. y Guiney, D. 1993. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* **61**: 5231-5236.
- Fierer, J., Krause, M., Tauxe, R. y Guiney, D. 1992. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J. Infect. Dis.* **166**: 639-642.
- Finlay, B.B., Frost, L.S. y Paranchych, W. 1986. Nucleotide sequences of the R1-19 plasmid transfer genes *traM*, *finP*, *traJ*, and *traY* and the *traYZ* promoter. *J. Bacteriol.* **166**: 368-374.
- Finlay, B.B., Frost, L.S. y Paranchych, W. 1986 a. Origin of transfer of IncF plasmids and nucleotide sequences of the type II *oriT*, *traM*, and *traY* alleles from ColB4-K98 and the type IV *traY* allele from R100-1. *J. Bacteriol.* **168**: 132-139.
- Fischetti, V.A. 1989. Streptococcal M protein: Molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**: 285-314.
- Friedrich, M.J., Kinsey, N.E., Vila, J. y Kadner, R.J. 1993. Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Mol. Microbiol.* **8**: 543-558.
- Frost, L.S., Ippen-Ihler, K. y Skurray, R.A. 1994. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**: 162-210.
- Gerlitz, M., Hrabak, O. y Schwab, H. 1990. Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J. Bacteriol.* **172**: 6194-6203.
- Guiney, D.G., Fang, F.C., Krause, M. y Libby, S. 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 1-9.
- Guiney, D.G., Fierer, J., Chikami, G., Beninger, P., Heffernan, E.J. y Tanabe, K. 1988. Characterization of virulence plasmids in *Salmonella*. En: Alan R.Liss, I. (Ed.) *Bacteria-Host Cell Interaction*. pp.329-345.
- Gulig, P.A., Caldwell, A.L. y Chiodo, V.A. 1992. Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* **6**: 1395-1411.
- Gulig, P.A. y Chiodo, V.A. 1990. Genetic and DNA sequence analysis of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene encoding the 28,000-molecular-weight protein. *Infect. Immun.* **58**: 2651-2658.
- Gulig, P.A. y Curtiss III, R. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**: 2891-2901.
- Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F. y Rhen, M. 1993. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* **7**: 825-830.
- Gulig, P.A. y Doyle, T.J. 1993. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect. Immun.* **61**: 504-511.
- Hackett, J., Kotlarski, I., Mathan, V., Francki, K. y Rowley, D. 1986. The colonization of peyer's patches by a strain of *Salmonella typhimurium* cured of the cryptic plasmid. *J. Infect. Dis.* **153**: 1119-1125.
- Hackett, J., Wyk, P., Reeves, P. y Mathan, V. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11 KD polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J. Infect. Dis.* **155**: 540-549.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: Glover, D.M. (Ed.) *DNA cloning*. IRL PRESS. Oxford, England. pp.120
- Harrison, J.A., Pickard, D., Higgins, C.F., Khan, A., Chatfield, S.N., Ali, T., Dorman, C.J., Hormaeche, C.E. y Dougan, G. 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae. *Mol. Microbiol.* **13**: 133-140.

- Heffernan, E.J., Fierer, J., Chikami, G. y Guiney, D. 1987. Natural history of oral *Salmonella dublin* infection in BALB/c mice: effect of an 80-Kb-pairs plasmid on virulence. *J. Infect. Dis.* **155**: 1254-1259.
- Heffernan, E.J., Harwood, J., Fierer, J. y Guiney, D. 1992 a. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* **174**: 84-91.
- Heffernan, E.J., Reed, S., Hackett, J., Fierer, J., Roudier, C. y Guiney, D. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. *J. Clin. Invest.* **90**: 953-964.
- Heffernan, E.J., Wu, L., Louie, J., Okamoto, S., Fierer, J. y Guiney, D.G. 1994. Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes *rck* from *Salmonella typhimurium* and *ail* from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **62**: 5183-5186.
- Heiskanen, P., Taira, S. y Rhen, M. 1994. Role of *rpoS* in the regulation of *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 125-130.
- Helmuth, R., Stephan, R., Bunge, C., Hoog, B., Steinbeck, A. y Bulling, E. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect. Immun.* **48**: 175-182.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. y Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6602-6606.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Holmgren, A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**: 9627-9632.
- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966.
- Hovi, M., Sukupolvi, S., Edwards, M.F. y Rhen, M. 1988. Plasmid-associated virulence of *Salmonella enteritidis*. *Microb. Pathog.* **4**: 385-391.
- Hultgren, S.J. y Normark, S. 1991. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 383-415.
- Hurme, R., Namork, E., Nurmiäho-Lassila, E.L. y Rhen, M. 1994. Intermediate filament-like network formed *in vitro* by a bacterial coiled coil protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 10675-10682.
- Ibáñez, M. y Rotger, R. 1993. Characterization of a small cryptic plasmid from *Salmonella enteritidis* that affects the growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**: 225-230.
- Ippen-Ihler, K.A. y Minkley, E.G. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 593-624.
- Ishihara, T., Tomita, H., Hasegawa, Y., Tsukagoshi, N., Yamagata, H. y Udaka, S. 1995. Cloning and characterization of the gene for a protein thiol- disulfide oxidoreductase in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **177**: 745-749.
- Jacob-Dubuisson, F., Heuser, J., Dodson, K., Normark, S. y Hultgren, S. 1993. Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. *EMBO J.* **12**: 837-847.
- Jacob-Dubuisson, F., Pinkner, J., Xu, Z., Striker, R., Padmanabhan, A. y Hultgren, S.J. 1994. PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11552-11556.
- Jander, G., Martin, N.L. y Beckwith, J. 1994. Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**: 5121-5127.
- Jones, G.W., Rabert, D.K., Svinarich, D.M. y Whitfield, H.J. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomus 60-Megadalton plasmids. *Infect. Immun.* **38**: 476-486.
- Kado, C.I. y Liu, S.-T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kamitani, S., Akiyama, Y. y Ito, K. 1992. Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J.* **11**: 57-62.
- Karremans, C. y Waard, A. 1988. Cloning and complete nucleotide sequences of the type II restriction-modification genes of *Salmonella infantis*. *J. Bacteriol.* **170**: 2527-2532.
- Kawahara, K., Haraguchi, Y., Tsuchimoto, M., Terakado, N. y Danbara, H. 1988. Evidence of correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella choleraesuis* and its virulence. *Microb. Pathog.* **4**: 155-163.
- Kitagawa, Y., Akaboshi, E., Shinagawa, H., Horii, T., Ogawa, H. y Kato, T. 1985. Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4336-4340.

- Koch, W.H., Cebula, T.A., Foster, P.L. y Eisenstadt, E. 1992. UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium* is *umuDC* dependent despite the presence of *samAB*. *J. Bacteriol.* **174**: 2809-2815.
- Koraimann, G. y Högenauer, G. 1989. A stable core region of the *tra* operon mRNA of plasmid R1-19. *Nucleic Acids Res.* **17**: 1283-1298.
- Korpela, K., Ranki, M., Sukupolvi, S., Mäkelä, P.H. y Rhen, M. 1989. Occurrence of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid-specific sequences in different serovars of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 49-54.
- Koski, P., Saarihahti, H., Sukupolvi, S., Taira, S., Riikonen, P., Osterlund, K., Hurme, R. y Rhen, M. 1992. A new alpha-helical coiled coil protein encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *J. Biol. Chem.* **267**: 12258-12265.
- Kowarz, L., Coynault, C., Robbe-Saule, V. y Norel, F. 1994. The *Salmonella typhimurium katF* (*rpoS*) gene: Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABC* virulence plasmid genes. *J. Bacteriol.* **176**: 6852-6860.
- Krause, M., Fang, F.C. y Guiney, D.G. 1992. Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella dublin* involves an unusual operon structure. *J. Bacteriol.* **174**: 4482-4489.
- Krause, M., Fierer, J. y Guiney, D. 1990. Homologous DNA sequences on the virulence plasmids of pathogenic *Yersinia* and *Salmonella dublin* Lane. *Mol. Microbiol.* **4**: 905-911.
- Krause, M. y Guiney, D.G. 1991. Identification of a multimer resolution system involved in stabilization of the *Salmonella dublin* virulence plasmid pSDL2. *J. Bacteriol.* **173**: 5754-5762.
- Krause, M., Harwood, J., Fierer, J. y Guiney, D. 1991 b. Genetic analysis of homology between the virulence plasmids of *Salmonella dublin* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**: 1860-1863.
- Krause, M., Roudier, C., Fierer, J., Harwood, J. y Guiney, D. 1991 a. Molecular analysis of the virulence locus of the *Salmonella dublin* plasmid pSDL2. *Mol. Microbiol.* **5**: 307-316.
- Krogfelt, K.A. 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 721-735.
- Kunamoto, C.A. 1991. Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol. Microbiol.* **5**: 19-22.
- Lackey, D., Walker, G.C., Keng, T. y Linn, S. 1977. Characterization of an endonuclease associated with the drug resistance plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* **131**: 583-588.
- Lam, S. y Roth, J.R. 1983. IS200: A *Salmonella*-specific insertion sequence. *Cell* **34**: 951-960.
- Lane, D., Feyter, R., Kennedy, M., Phua, S.H. y Semon, D. 1986. D protein of miniF plasmid acts as repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res.* **14**: 9713-9728.
- Langer, P.J. y Walker, G.C. 1981. Restriction endonuclease cleavage map of pKM101: Relationship to parental plasmid R46. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 268-272.
- Lax, A.J., Pullinger, G.D., Baird, G.D. y Williamson, C.M. 1990. The virulence plasmid of *Salmonella dublin*: Detailed restriction map and analysis by transposon mutagenesis. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1117-1123.
- Liu, S.L., Hessel, A. y Sanderson, K.E. 1993. The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic map of *Salmonella enteritidis* shows an inversion relative to *Salmonella typhimurium* LT2. *Mol. Microbiol.* **10**: 655-664.
- Lodwick, D., Owen, D. y Strike, P. 1990. DNA sequence analysis of the *imp* UV protection and mutation operon of the plasmid TP110: identification of a third gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5045-5050.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.J. y McCowen, J.M. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417-420.
- Mandel, M. y Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 154-157.
- Martin, J.L., Bardwell, J.C.A. y Kuriyan, J. 1993. Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature* **365**: 464-468.
- Matsui, H., Abe, A., Kawahara, K., Terakado, N. y Danbara, H. 1991. Positive regulator for the expression of Mba protein of the virulence plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis*. *Microb. Pathog.* **10**: 459-464.
- Matsui, H., Abe, A., Suzuki, S., Kijima, M., Tamura, Y., Nakamura, M., Kawahara, K. y Danbara, H. 1993. Molecular mechanism of the regulation of expression of plasmid-encoded mouse bacteremia (*mba*) genes in *Salmonella* serovar Choleraesuis. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 219-226.
- Matsutani, S., Ohtsubo, H., Maeda, Y. y Ohtsubo, E. 1987. Isolation and characterization of IS elements repeated in the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.* **196**: 445-455.

- Michiels, T., Popoff, M.Y., Durviaux, S., Coynault, C. y Cornelis, G. 1987. A new method for the physical and genetic mapping of large plasmids: application to the localisation of the virulence determinants on the 90 kb plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **3**: 109-116.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. y Raina, S. 1993. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7084-7088.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. y Raina, S. 1994. The *Escherichia coli dsbC* (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**: 2013-2020.
- Missiakas, D., Schwager, F. y Raina, S. 1995. Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**: 3415-3424.
- Montenegro, M.A., Bitter-Suermann, D., Timmis, J.K., Agüero, M.E., Cabello, F.C., Sanyal, S.C. y Timmis, K.N. 1985. *traT* gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1511-1521.
- Montenegro, M.A., Morelli, G. y Helmut, R. 1991. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb. Pathog.* **11**: 391-397.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M. y Lusty, C.J. 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**: 299-310.
- Nakamura, M., Sato, S., Ohya, T., Suzuki, S. y Ikeda, S. 1985. Possible relationship of a 36-Megadalton *Salmonella enteritidis* plasmid to virulence in mice. *Infect. Immun.* **47**: 831-833.
- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T. y Hiraga, S. 1991. The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* **10**: 183-193.
- Nohmi, T., Hakura, A., Nakai, Y., Watanabe, M., Murayama, S.Y. y Sofuni, T. 1991. *Salmonella typhimurium* has two homologous but different *umuDC* operons: cloning of a new *umuDC*-like operon (*samAB*) present in a 60-megadalton cryptic plasmid of *S. typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 1051-1063.
- Nohmi, T., Yamada, M., Matsui, M., Matsui, K., Watanabe, M. y Sofuni, T. 1995. Involvement of *umuDCst* genes in nitropyrene-induced -CG frameshift mutagenesis at the repetitive CG sequence in the *hisD3052* allele of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 7-16.
- Nohmi, T., Yamada, M., Watanabe, M., Murayama, S.Y. y Sofuni, T. 1992. Roles of *Salmonella typhimurium umuDC* and *samAB* in UV mutagenesis and UV sensitivity. *J. Bacteriol.* **174**: 6948-6955.
- Norel, F., Coynault, C., Miras, I., Hermant, D. y Popoff, M.Y. 1989 b. Cloning and expression of plasmid DNA sequences involved in *Salmonella* serotype Typhimurium virulence. *Mol. Microbiol.* **3**: 733-743.
- Norel, F., Pisano, M.R., Nicoli, J. y Popoff, M.Y. 1989 a. A plasmid-borne virulence region (2.8 kb) from *Salmonella typhimurium* contains two open reading frames. *Res. Microbiol.* **140**: 627-630.
- Norel, F., Pisano, M.R., Nicoli, J. y Popoff, M.Y. 1989. Nucleotide sequence of the plasmid-borne virulence gene *mkfA* encoding a 28 kDa polypeptide from *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* **140**: 263-265.
- O'Byrne, C.P. y Dorman, C.J. 1994. Transcription of the *Salmonella typhimurium spv* virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 99-106.
- Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N. y Fujii, Y. 1995. Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.* **177**: 4579-4586.
- Ou, J.T., Baron, L.S., Dai, X. y Life, C.A. 1990. The virulence plasmids of *Salmonella* serovars *typhimurium*, *choleraesuis*, *dublin*, and *enteritidis*, and the cryptic plasmids of *Salmonella* serovars *copenhagen* and *sendai* belong to the same incompatibility group, but not those of *Salmonella* serovars *durban*, *gallinarum*, *give*, *infantis* and *pullorum*. *Microb. Pathog.* **8**: 101-107.
- Ou, J.T., Lin, M.Y. y Chao, H.L. 1994. Presence of F-like OriT base-pair sequence on the virulence plasmids of *Salmonella* serovars *Gallinarum*, *Enteritidis*, and *Typhimurium*, but absent in those of *Choleraesuis* and *Dublin*. *Microb. Pathog.* **17**: 13-21.
- Pardon, P., Popoff, M.Y., Coynault, C., Marly, J. y Miras, I. 1986. Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **137 B**: 47-60.
- Peek, J.A. y Taylor, R.K. 1992. Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6210-6214.

- Perry, K.L., Elledge, S.J., Mitchell, B.B., Marsh, L. y Walker, G.C. 1985. *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA proteins share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4331-4335.
- Pérez-Casal, J.F., Gammie, A.E. y Crosa, J.H. 1989. Nucleotide sequence analysis and expresion of the minimum REPI replication region and incompatibility determinants of pColV-K30. *J. Bacteriol.* **171**: 2195-2201.
- Pohlman, R.F., Liu, F., Wang, L., Moré, M.I. y Winans, S.C. 1993. Genetic and biochemical analysis of an endonuclease encoded by the IncN plasmid pKM101. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4867-4872.
- Popoff, M.Y., Miras, I., Coynault, C., Lasselin, C. y Pardon, P. 1984. Molecular relationships between virulence plasmids of *Salmonella* serotypes Typhimurium and Dublin and large plasmids of other *Salmonella* serotypes. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol* **135 A**: 389-398.
- Pullinger, G.D., Baird, G.D., Williamson, C.M. y Lax, A.J. 1989. Nucleotide sequence of a plasmid gene involved in the virulence of salmonellas. *Nucleic Acids Res.* **17**: 7983.
- Pullinger, G.D. y Lax, A.J. 1992. A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Mol. Microbiol.* **6**: 1631-1643.
- Rees, C.E.D., Bradley, D.E. y Wilkins, B.M. 1987. Organization and regulation of the conjugation genes of IncI plasmid ColIb-P9. *Plasmid* **18**: 223-236.
- Rhen, M., Riikonen, P. y Taira, S. 1993. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* virulence plasmid genes in cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* **10**: 45-56.
- Rhen, M. y Sukupolvi, S. 1988. The role of the *traT* gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid for serum resistance and growth within liver macrophages. *Microb. Pathog.* **5**: 275-285.
- Riikonen, P., Makela, P.H., Saarilahti, H., Sukupolvi, S., Taira, S. y Rhen, M. 1992. The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages. *Microb. Pathog.* **13**: 281-291.
- Rioux, C.R., Friedrich, M.J. y Kadner, R.J. 1990. Genes on the 90-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* confer low-affinity cobalamin transport: Relationship to fimbria biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **172**: 6217-6222.
- Rioux, C.R. y Kadner, R.J. 1989. Two outer membrane transport systems for vitamin B12 in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**: 2986-2993.
- Rossolini, G.M., Muscas, P., Chiesurin, A. y Satta, G. 1993. Analysis of the *Salmonella fim* gene cluster: identification of a new gene (*fimI*) encoding a fimbrin-like protein and located downstream from the *fimA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**: 259-266.
- Rotger, R., Rodríguez-Peña, J.M., Buisán, M. y Ibáñez, M. 1996. Genética de la virulencia de *Salmonella*. En: Casadesús, J. (Ed.) *Microbiología y genética molecular*. Universidad de Huelva. (En prensa).
- Roudier, C., Krause, M., Fierer, J. y Guiney, D.G. 1990. Correlation between the presence of sequences homologous to the *vir* region of *Salmonella dublin* plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two *Salmonella* serotypes in mice. *Infect. Immun.* **58**: 1180-1185.
- Ryu, J. y Hartin, R.J. 1990. Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *BioTechniques* **8**: 43-44.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanderson, K.E., Hessel, A. y Rudd, K.H. 1995. Genetic map of *Salmonella typhimurium*, Edition VIII. *Microbiol. Rev.* **59**: 241-303.
- Satta, G., Ingianni, A., Muscas, P., Rossolini, G.M. y Pompei, R. 1993. The pathogenicity determinants of *Salmonella typhi*: Potential role of fimbrial structures. En: Cabello, F., Hormaeche, C., Mastroeni, P. y Bonina, L. (Eds.) *Biology of Salmonella*. Plenum Press. New York. pp.83-90.
- Saul, D., Spiers, A.J., McAnulty, J., Gibbs, M.G., Bergquist, P.L. y Hill, D.F. 1989. Nucleotide sequence and replication characteristics of RepFIB, a basic replicon of IncF plasmids. *J. Bacteriol.* **171**: 2697-2707.
- Schatz, P.J. y Beckwith, J. 1990. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 215-248.
- Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Sedgwick, S.G., Ho, C. y Woodgate, R. 1991. Mutagenic DNA repair in Enterobacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 5604-5611.
- Shevchik, V.E., Condemine, G. y Robert-Baudouy, J. 1994. Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J.* **13**: 2007-2012.
- Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J. y Schoolnik, G.K. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* **7**: 563-575.

- Spink, J.M., Pullinger, G.D., Wood, M.W. y Lax, A.J. 1994. Regulation of *spvR*, the positive regulatory gene of *Salmonella* plasmid virulence genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 113-122.
- Stanley, J., Goldsworthy, M. y Threlfall, E.J. 1992. Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**: 153-160.
- Strack, B., Lessl, M., Calendar, R. y Lanka, E. 1992. A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the alpha protein of the *Escherichia coli* satellite phage P4\*. *J. Biol. Chem.* **267**: 13062-13072.
- Sukupolvi, S., Riikonen, P., Taira, S., Saarilahti, H. y Rhen, M. 1992. Plasmid-mediated serum resistance in *Salmonella enterica*. *Microb. Pathog.* **12**: 219-225.
- Sukupolvi, S., Vuorio, R., Qi, S.-Y., O'Connor, D. y Rhen, M. 1990. Characterization of the *traT* gene and mutants that increase outer membrane permeability from the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* **4**: 49-57.
- Suzuki, S., Komase, K., Matsui, H., Abe, A., Kawahara, K., Tamura, Y., Kijima, M., Danbara, H., Nakamura, M. y Sato, S. 1994. Virulence region of plasmid pNL2001 of *Salmonella enteritidis*. *Microbiology.* **140**: 1307-1318.
- Taira, S., Baumann, M., Riikonen, P., Sukupolvi, S. y Rhen, M. 1991. Amino-terminal sequence analysis of four plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 319-324.
- Taira, S., Heiskanen, P., Hurme, R., Heikkila, H., Riikonen, P. y Rhen, M. 1995. Evidence for functional polymorphism of the *spvR* gene regulating virulence gene expression in *Salmonella*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 437-444.
- Taira, S. y Rhen, M. 1989. Identification and genetic analysis of *mkaA*—a gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid necessary for intracellular growth. *Microb. Pathog.* **7**: 165-173.
- Taira, S., Riikonen, P., Saarilahti, H., Sukupolvi, S. y Rhen, M. 1991 a. The *mkaC* virulence gene of the *Salmonella* serovar Typhimurium 96 kb plasmid encodes a transcriptional activator. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 381-384.
- Tarkkanen, A.-M., Allen, B.L., Westerlund, B., Holthofer, H., Kuusela, P., Risteli, L., Clegg, S. y Korhonen, T.K. 1990. Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol. Microbiol.* **4**: 1353-1361.
- Terakado, N., Hamaoka, T. y Danbara, H. 1988. Plasmid mediated serum resistant and alterations in the composition of lipopolysaccharides in *Salmonella dublin*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2089-2093.
- Terakado, N., Sekizaki, T., Hashimoto, K. y Naitoh, S. 1983. Correlation between the presence of a fifty-Megadalton plasmid in *Salmonella dublin* and virulence for mice. *Infect. Immun.* **41**: 443-444.
- Thomas, S.M., Crowne, H.M., Pidsley, S.C. y Sedgwick, S.G. 1990. Structural characterization of the *Salmonella typhimurium* LT2 *umu* operon. *J. Bacteriol.* **172**: 4979-4987.
- Tinge, S.A. y Curtis III, R. 1990. Conservation of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid maintenance regions among *Salmonella* serovars as a basis for plasmid curing. *Infect. Immun.* **58**: 3084-3092.
- Tinge, S.A. y Curtiss III, R. 1990 a. Isolation of the replication and partitioning regions of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid and stabilization of heterologous replicons. *J. Bacteriol.* **172**: 5266-5277.
- Tomb, J.-F. 1992. A periplasmic protein disulfide oxidoreductase is required for transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10252-10256.
- Turcotte, C. y Woodward, M.J. 1993. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1477-1485.
- Usera, M.A., Cano, R. y Echeíta, M.A. 1995. Análisis de los serotipos de *Salmonella* sp. aisladas en España en el periodo 1988-1992. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **13**: 138-145.
- Valone, S.E., Chikami, G.K. y Miller, V.L. 1993. Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B, and -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* **61**: 705-713.
- van Biesen.T. y Frost, L.S. 1994. The FinO protein of IncF plasmids binds FinP antisense RNA and its target, *traJ* mRNA, and promotes duplex formation. *Mol. Microbiol.* **14**: 427-436.
- Vandenbosch, J.L., Kurlandsky, D.R., Urdangaray, R. y Jones, G.W. 1989. Evidence of coordinate regulation of virulence in *Salmonella typhimurium* involving the *rsk* element of the 95-kilobase plasmid. *Infect. Immun.* **57**: 2566-2568.
- Vandenbosch, J.L., Rabert, D.K., Kurlandsky, D.R. y Jones, G.W. 1989 a. Sequence analysis of *rsk*, a portion of the 95-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* associated with resistance to the bactericidal activity of serum. *Infect. Immun.* **57**: 850-857.

- Vanooteghem, J.-C. y Cornelis, G.R. 1990. Structural and functional similarities between the replication region of the *Yersinia* virulence plasmid and the RepFIIA replicons. *J. Bacteriol.* **172**: 3600-3608.
- Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. y Sasakawa, C. 1995. Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4927-4931.
- Willetts, N. y Maule, J. 1985. Specificities of IncF plasmid conjugation genes. *Genet. Res.* **47**: 1-11.
- Williamson, C.M., Baird, G.D. y Manning, E.J. 1988. A common virulence region on plasmids from eleven serotypes of *Salmonella*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 975-982.
- Williamson, C.M., Pullinger, G.D. y Lax, A.J. 1988 a. Identification of an essential virulence region on *Salmonella* plasmids. *Microb. Pathog.* **5**: 469-473.
- Winans, S.C. y Walker, G.C. 1983. Genetic localization and characterization of a pKM101-coded endonuclease. *J. Bacteriol.* **154**: 1117-1125.
- Winans, S.C. y Walker, G.C. 1985. Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* **161**: 402-410.
- Woodgate, R. y Sedgwick, S.G. 1992. Mutagenesis induced by bacterial UmuDC proteins and their plasmid homologues. *Mol. Microbiol.* **6**: 2213-2218.
- Wunderlich, M., Jaenicke, R. y Glockshuber, R. 1993. The redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) of *Escherichia coli* result from a tense conformation of its oxidized form. *J. Mol. Biol.* **233**: 559-566.
- Wunderlich, M., Otto, A., Maskos, K., Mücke, M., Seckler, R. y Glockshuber, R. 1995. Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* **247**: 28-33.
- Yamanaka, H., Kameyama, M., Baba, T., Fujii, Y. y Okamoto, K. 1994. Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J. Bacteriol.* **176**: 2906-2913.
- Yoshioka, Y., Fujita, Y. y Ohtsubo, E. 1990. Nucleotide sequence of the promoter-distal region of the *tra* operon of plasmid R100, including *traI* (DNA helicase I) and *traD* genes. *J. Mol. Biol.* **214**: 39-53.
- Yoshioka, Y., Ohtsubo, H. y Ohtsubo, E. 1987. Repressor gene *finO* in plasmids R100 and F: constitutive transfer of plasmid F is caused by insertion of IS3 into F *finO*. *J. Bacteriol.* **169**: 619-623.
- Yu, J., McLaughlin, S., Freedman, R.B. y Hirst, T.R. 1993. Cloning and active site mutagenesis of *Vibrio cholerae* DsbA, a periplasmic enzyme that catalyzes disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* **268**: 4326-4330.
- Yu, J., Webb, H. y Hirst, T.R. 1992. A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1949-1958.
- Zapun, A., Bardwell, J.C.A. y Creighton, T.E. 1993. The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* **32**: 5083-5092.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. y Creighton, T.E. 1995. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**: 5075-5089.